

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003739

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-167755  
Filing date: 04 June 2004 (04.06.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 6 月 4 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 6 7 7 5 5

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

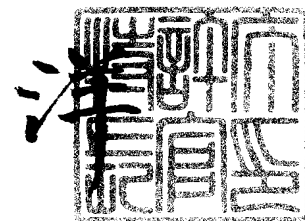
J P 2 0 0 4 - 1 6 7 7 5 5

出 願 人  
Applicant(s): 電気化学工業株式会社  
中外製薬株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	041187
【提出日】	平成16年 6月 4日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C08B
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社 中央 研究所内
【氏名】	池谷 仁志
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社 中央 研究所内
【氏名】	守川 忠志
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社 中央 研究所内
【氏名】	高橋 浩一
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
【氏名】	田村 達也
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
【氏名】	岡町 晃
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
【氏名】	石澤 武宣
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
【氏名】	佐藤 晴彦
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
【氏名】	樋口 義信
【特許出願人】	
【識別番号】	000003296
【氏名又は名称】	電気化学工業株式会社
【特許出願人】	
【識別番号】	000003311
【氏名又は名称】	中外製薬株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100089705
【弁理士】	
【氏名又は名称】	社本 一夫
【選任した代理人】	
【識別番号】	100076691
【弁理士】	
【氏名又は名称】	増井 忠武
【選任した代理人】	
【識別番号】	100075270
【弁理士】	
【氏名又は名称】	小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100080137

【弁理士】

【氏名又は名称】 千葉 昭男

【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【電話番号】 03-3270-6641

【ファクシミリ番号】 03-3246-0233

【連絡先】 担当

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2004- 62616

【出願日】 平成16年 3月 5日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0107764

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

ヒアルロン酸、ヒアルロン酸誘導体またはそれらの塩のカルボキシル基に、1～8個のアミノ酸からなるペプチド鎖を含有するリンカーを介してメトトレキサートが結合した、ヒアルロン酸－メトトレキサート結合体。

【請求項 2】

リンカーが、1～8個のアミノ酸からなるペプチド鎖、ならびにC<sub>2</sub>－20アルキレンジアミン鎖を含み、当該アルキレンジアミン鎖は、1～5個の酸素原子が挿入されていてもよくおよび／またはカルボキシル基またはC<sub>1</sub>－6アルコキシカルボニル基で置換されていてもよい、請求項 1 に記載のヒアルロン酸－メトトレキサート結合体。

【請求項 3】

ヒアルロン酸の総カルボキシル基に対するメトトレキサートの結合率が0.5%～4.5%である、請求項 1 または 2 に記載のヒアルロン酸－メトトレキサート結合体。

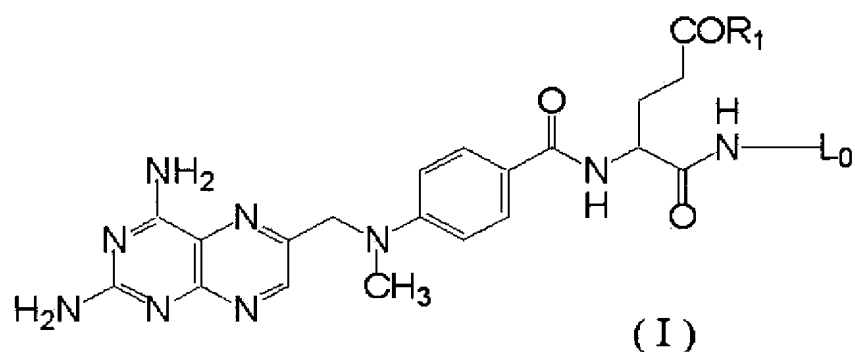
【請求項 4】

ヒアルロン酸の分子量が60万ダルトン以上である請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のヒアルロン酸－メトトレキサート結合体。

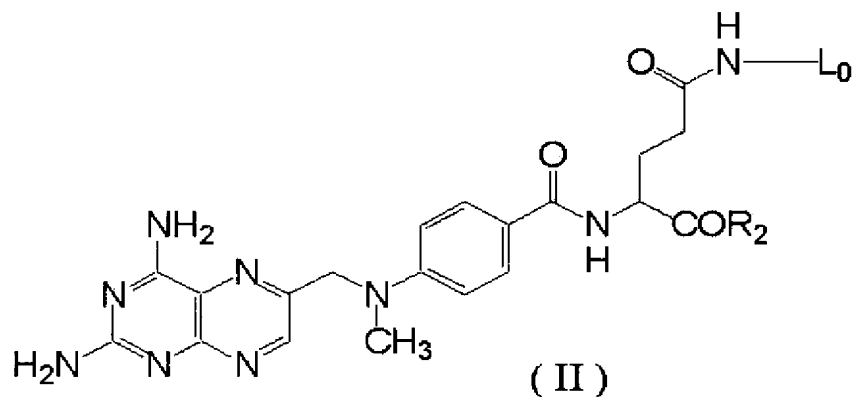
【請求項 5】

リンカーに結合したメトトレキサートが、式 (I)、(II)、(III) または (IV)：

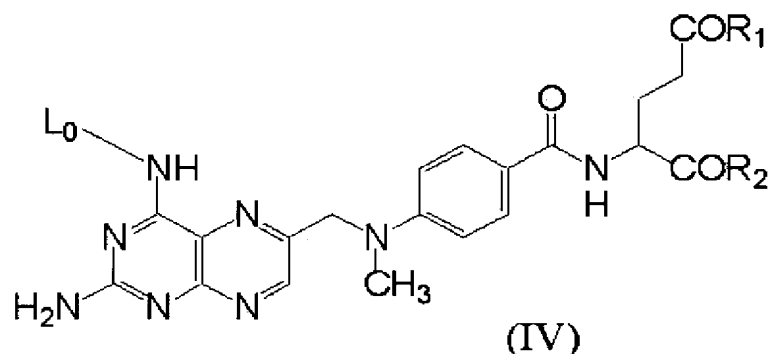
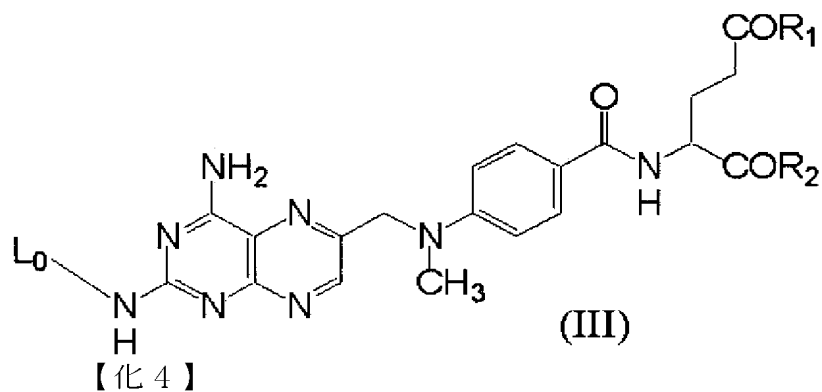
【化 1】



【化 2】



【化 3】



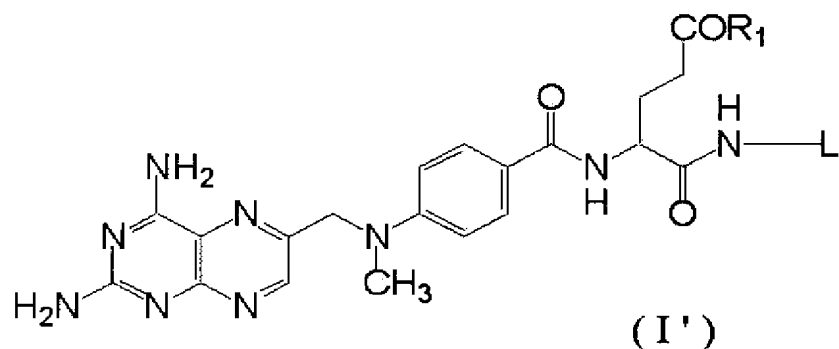
【式中、 $R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、 $C_{1-6}$  アルコキシ基、 $C_{1-6}$  アルキルアミノ基、またはジ- $C_{1-6}$  アルキルアミノ基であり； $L_0$  は、リンカーの結合位置である。】

で表される、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体。

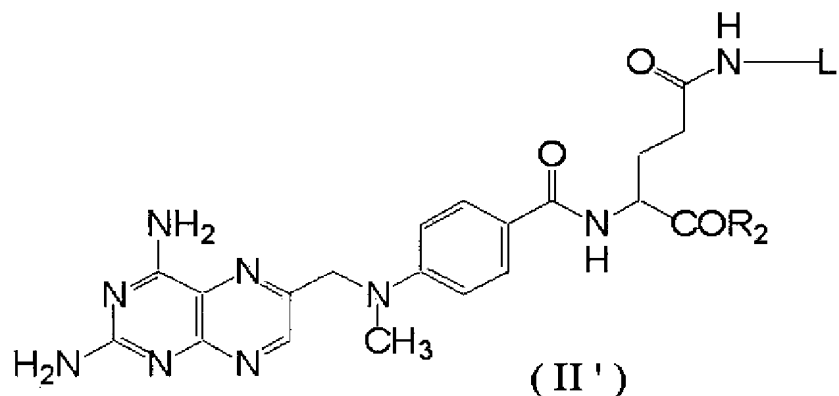
【請求項 6】

ペプチド鎖を含有するリンカーおよび当該リンカーに結合したメトトレキサートが、式 (I') または (II')：

【化 5】

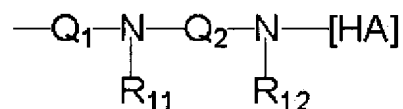


【化 6】



【式中、 $R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、 $C_{1-6}$  アルコキシ基、 $C_{1-6}$  アルキルアミノ基、またはジ- $C_{1-6}$  アルキルアミノ基であり；  
L は、式 (X)

【化 7】



（式中、 $Q_1$  は結合する  $-NH-$  と一緒になって 1 ～ 8 個のアミノ酸からなるペプチド鎖を形成し、当該ペプチド鎖に含まれる残基およびアミド結合は  $C_{1-6}$  アルキル基、 $C_{1-6}$  アルキルカルボニル基で置換されていてもよく、残基に含まれるカルボキシル基は  $C_{1-6}$  アルキル基で置換されていてもよいアミド基に変換されていてもよく；

$R_{11}$  および  $R_{12}$  はそれぞれ独立に水素原子または  $C_{1-6}$  アルキル基であり；

$Q_2$  は  $C_{2-20}$  アルキレンであり、当該アルキレンは 1 ～ 5 個の酸素原子が挿入されていてもよくおよび／またはカルボキシル基または  $C_{1-6}$  アルコキシカルボニル基で置換されていてもよく；および

【HA】はヒアルロン酸との結合位置を表し、当該リンカーは当該ヒアルロン酸に含まれるカルボキシル基とアミド結合を形成する。）で表されるリンカーである。】

で表される、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体を有効成分として含有する医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体を有効成分として含有する関節疾患治療薬。

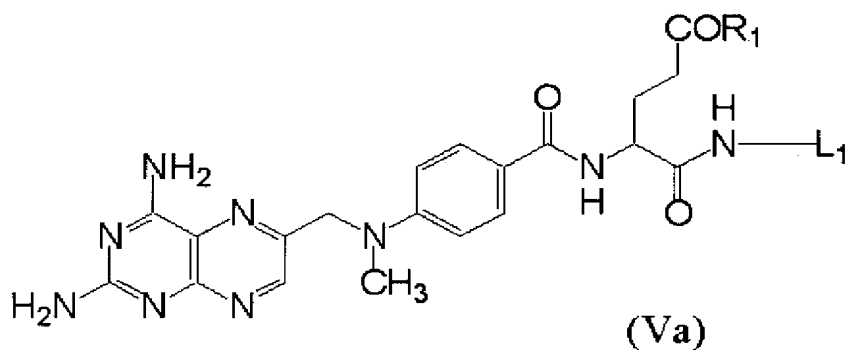
【請求項 9】

関節局所投与製剤である請求項 8 記載の関節疾患治療薬。

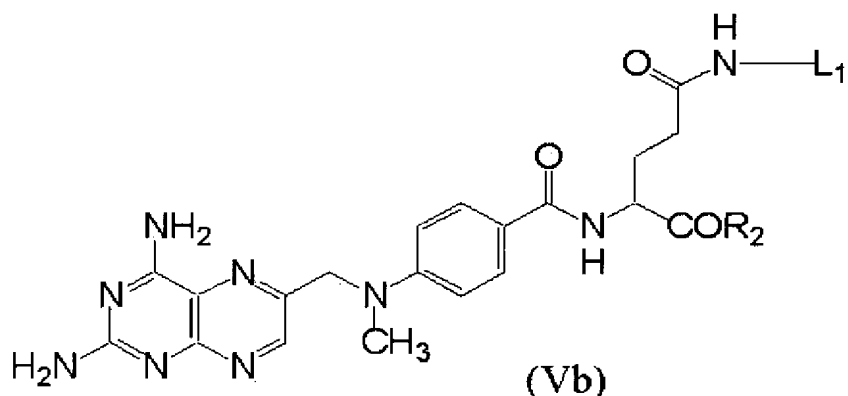
【請求項 10】

式 (Va) または (Vb)：

【化 8】

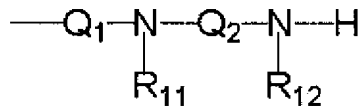


【化 9】



【式中、 $R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、 $C_{1-6}$  アルコキシ基、 $C_{1-6}$  アルキルアミノ基、またはジ- $C_{1-6}$  アルキルアミノ基であり；  
 $L_1$  は、式 (X')

【化 10】



(式中、 $Q_1$  は結合する  $-NH-$  と一緒になって 1～8 個のアミノ酸からなるペプチド鎖を形成し、当該ペプチド鎖に含まれる残基およびアミド結合は  $C_{1-6}$  アルキル基、 $C_{1-6}$  アルコシカルボニル基で置換されていてもよく、当該残基に含まれるカルボキシル基は  $C_{1-6}$  アルキルで置換されていてもよいアミド基に変換されていてもよく；

$R_{11}$  および  $R_{12}$  はそれぞれ独立に水素原子または  $C_{1-6}$  アルキルであり；

$Q_2$  は  $C_{2-20}$  アルキレンであり、当該アルキレンは 1～5 個の酸素原子が挿入されていてもよくおよび／またはカルボキシル基または  $C_{1-6}$  アルコシカルボニル基で置換されていてもよい。) である。]

の化合物。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の式 (Va) または (Vb) の化合物をヒアルロン酸と反応させ、当該ヒアルロン酸のカルボキシル基を N-置換アミド基に変換する工程を含む、請求項 1 に記載のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体の製造方法。



【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒアルロン酸－メトトレキサート結合体

【技術分野】

【0001】

本発明はヒアルロン酸－メトトレキサート結合体、及びその医薬用途に関する。

【背景技術】

【0002】

変形性関節症（以下、OAとも称す）は加齢を基盤として発症する、いわゆる退行性疾患の一種である。高齢化社会の現在、患者数は増加の一途を辿っているが、未だ十分な診断法、治療法は確立されていない。OAで最初に起こる病態変化は、加齢によるメカニカルストレスが引き金となった関節軟骨の変性と磨耗であると考えられている。この変化は極めてゆるやかな速度で進行し徐々に痛みへと進展する。

【0003】

現在のOA薬物治療では、全身療法として、1）解熱鎮痛薬（アセトアミノフェン）、2）非ステロイド性抗炎症薬（以下、NSAIDsとも称す）、局所療法（関節内注入）として、3）ヒアルロン酸（以下、HAとも称す）製剤、および4）ステロイド製剤が使用されている。従来、NSAIDsをはじめとする全身的な薬物療法を行っても関節局所の疼痛や腫脹が軽快しない場合、抗炎症作用が最も優れているステロイド製剤の関節内注入が行われてきた。しかし、ステロイド製剤は、関節注入症候群（ステロイド関節症）や全身性の副作用など安全性の面で問題がある。そのため、ステロイド製剤に代わる安全な関節内注入剤として、HA製剤の有用性が高まりつつある。

【0004】

HAは、N－アセチルグルコサミンとグルクロン酸との繰り返し単位より構成される生体内多糖である。HAは、関節液を構成する主成分として関節液の粘弾性、荷重吸収作用および潤滑作用の保持に働いており、また軟骨マトリックスにおいては、軟骨プロテオグリカンと結合してアグリカンと呼ばれる重合体を形成し、水分保持能と粘弾性の維持に中心的な役割を担っている。

【0005】

分子量約60万ダルトン以上のHAおよびその架橋物を膝関節内に注入するとOAの疼痛が除去されることから、HA製剤はOAの治療法の一つとして広く用いられている。また、正常関節液中のHAの分子量に近い高分子量タイプのHA製剤（商品名 スベニール（商標）、製造販売 中外製薬株式会社）は、日本において関節リウマチ（以下、RAとも称す）に伴う膝の疼痛除去にも適用が認められている。なお、HAの分子量は薬効の強さと相関があり、高分子量タイプのHAの方が、低分子量タイプのHAよりも持続性に優れ、より強い薬効を示すと言われている。

【0006】

一般に、HA製剤は、OA（または関節リュウマチ（以下、RAとも称す））の病態で損なわれた関節液の粘性と弾性を正常に戻すことにより疼痛を除去していると考えられている。しかし、外部から加えたHA製剤は関節液中から数日以内には消失してしまうにもかかわらず、効果は長期間持続するため、上記の関節液の粘弾性改善とは異なる機序で疼痛除去に働いている可能性も示唆されている。そのような機序の1つとして、後述のOA滑膜炎に対する抑制効果が挙げられる。

【0007】

さて、OAの痛みや炎症の発症メカニズムについては、未だ不明な点が多いが、最近では軟骨の変性によって二次的に引き起こされる滑膜炎との関連性が注目されている。OA滑膜炎は関節水症や熱感など疼痛、炎症症状の主たる原因となるのみならず、タンパク分解酵素、サイトカインやラジカルの産生を介して関節破壊をも促進するため、OAの病態を進展させる主要な増悪因子と考えられている。また、OA滑膜炎は、RAで見られるような著しい増殖性変化はないものの、滑膜細胞の増殖、血管新生と充血、滑膜下の浮腫および線維化など、RA滑膜炎に共通した面も多く認められている。このように、OAの疼

痛や炎症をより効率よく除去し、病態の進展を防ぐという見地から、O A 滑膜炎の制御は重要である。

#### 【0008】

滑膜に対するH Aの作用は未だ十分には解明されていないが、アイソトープを使った実験から、H Aは関節腔よりも滑膜に集積し、より長期に存在することが知られている。また、滑膜組織を構成する滑膜細胞の表層には、H Aを認識するレセプター（C D 4 4やR H A M M（r e c e p t o r f o r H A－m e d i a t e d m o t i l i t y））が存在し、滑膜細胞は表層のC D 4 4を介して、分子量200万以上のH Aをも細胞内に取り込む機構が備わっていることも報告されている。これらの知見から、H Aの疼痛除去作用の少なくとも一部は、滑膜への作用を介して発現している可能性が示唆されているが、しかしながらH A製剤は、O A滑膜炎で引き起こされる炎症症状そのものを抑制するまでの作用はなく、炎症症状の強いO AやR Aに対する効果は決して十分ではない。

#### 【0009】

一方、滑膜炎を制御する薬物としては、R Aの治療で用いられる修飾性抗リウマチ薬（以下、D M A R Dとも称す）と呼ばれる薬物群が良く知られている。その中でも特にメトトレキサート（以下、M T Xとも称す）は、効力が優れていること、作用発現までの時間が比較的短いこと、などの長所を有する薬剤である。しかし、M T Xは全身投与でのみ使用を認められている（現在、日本において、R A治療薬として医薬品の承認を受けているものはカプセル剤のみである。海外では、錠剤と注射剤が承認を受けている。）ため、治療目的部位である関節以外の部位で、その作用メカニズムに起因する重篤な副作用（肝障害、造血障害、肺障害、消化管障害など）を起こすことが知られている。その結果、使用に当たっては十分な副作用のモニタリングと副作用発症時の対策が不可欠である。こうした副作用の懸念の大きさから、M T Xをはじめとする滑膜炎抑制薬は、R Aに比べ症状の軽いO Aなどの他の関節疾患への適応は認められていない。言い換えれば、M T Xの全身性の副作用を軽減する手段、もしくは薬効発現に必要な部位でのみM T Xの作用を発現できる手段を見出せれば、より安全なR A治療法を提供するのみならず、広範囲の関節疾患にM T Xを用いることが可能となる。

#### 【0010】

M T Xの副作用を軽減し、望ましい薬効のみを引き出す手段として、これまでもM T Xの作用を関節内や滑膜にのみ限局させるための方法がいくつか試みられている。例えば、M T Xを単独で局所投与（関節内投与）する方法が報告されているが、関節内からM T Xが速やかに消失してしまうため十分な薬効を発揮できない。また、リポゾーム化したM T Xを用いることによって、マクロファージによる貪食能を利用して関節内貯留性を向上させる方法も報告されているが、未だに臨床での有用性は確かめられていない。このように、関節疾患治療薬としてのM T Xの副作用を軽減し、期待される薬効のみを引き出すためには、なお技術的な改良が必要である。

#### 【0011】

上述のように、滑膜はH Aが集積しやすい組織である。また、滑膜細胞はC D 4 4などのH Aレセプターを介してH Aを細胞内に取り込む機構を備えている。そのため、H Aは薬物を滑膜に集積させるためのキャリアになりうる可能性が考えられる。これまでに、薬物の生体内キャリアとして、H Aを利用する技術はいくつか報告されている。しかし、M T Xを代表例とする関節疾患治療薬、特に滑膜炎制御に適した薬物のドラッグデリバリーシステム（以下、D D Sとも称す）創出に関する技術への応用例はほとんど知られていない。

#### 【0012】

これまでの報告例としては、例えば、H Aを含む多糖体にペプチド鎖を介して薬物を結合した多糖体－薬物結合体が知られている（特許文献1：特開平5－39306号、特許文献2：国際公開W O 9 4／19376号など）。これらはいずれも癌組織移行性をうたった抗癌剤のD D S技術に関するものである。

#### 【0013】

特開平5-39306号では、抗癌剤としての目的でMTXが用いられている。しかし、癌組織への移行性と長期体内残留性の無さとを特徴としていることから、抗癌作用を高めるためにMTXの結合率は高く（実施例では6.4～19%）、かつ、HAの分子量は低い（実施例では10万ダルトン）。また、HAのヒドロキシ基にイソウレア結合によりペプチド鎖が結合しているため、水溶液中での安定性は低い。

#### 【0014】

一方、HAと薬物とを結合させた結合体（コンジュゲート）を関節疾患治療薬に利用した報告例もある。例えば、国際公開WO99/59603号（特許文献3）では、ブチレンアミン基（ $-C_4H_8NH-$ ）およびオクチレンアミン基（ $-C_8H_{16}NH-$ ）などのスペーサーを介して結合したHAと薬物の結合体が開示されている。当該特許文献において、当該結合体は、細胞外での薬効を想定して、薬物が結合したままの状態での薬効を発現するものとして記載されている。実際、当該結合体ではスペーサーを介しての薬物とHAとの結合が比較的強固なため、MTXのように結合体から遊離しなければ薬効を発揮できない薬物への適応は困難である。

#### 【0015】

それに加え、当該特許文献はマトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤（以下、MMP Iとも称す）を薬物として用いた結合体に向けられており、開示されている実施例もMMP Iの結合体に関するもののみである。薬物としてMTXを用いた結合体は何ら具体的に開示されておらず、その医薬としての有用性について何らの記載も含まれていない。

国際公開WO02/44218号（特許文献4）では、13-アミノ-4,7,10-トリオキサトリデカニル基に更に特殊な基（ノルボルネン）を結合させたスペーサーを用い、ノルボルネンとHAのヒドロキシ基とのカルバメート結合の形成により生成したHA-薬物結合体が開示されている。しかし、当該結合体も特許文献2と同様に細胞外での薬効を想定したものと考えられ、薬物が結合したままの状態での薬効を発現する。従って、結合体から遊離しなければ薬効を発揮できない薬物、例えばMTXへの適応は困難である。さらに、特許文献3は、MMP Iを薬物として用いた結合体に向けられており、薬物としてMTXを用いた結合体については何ら示唆されていない。

#### 【0016】

以上述べた通り、上記の文献にはMTXを用いたHA-MTX結合体について何ら記載されておらず、HA-MTX結合体を関節疾患治療薬として使用することに関し何ら記載も示唆もされていない。

#### 【0017】

また、先行技術として知られているHA-薬物結合体の合成方法では、合成過程でHAの分子量が大きく低下してしまい、HAの薬効が損なわれてしまうことを本発明者らは確認している。従来のHA-薬物結合体の合成方法では一般的な有機合成反応条件や後処理条件が用いられているが、高分子量のHAと薬物との結合体を調製するには、更なる改良が必要である。

#### 【0018】

このように、医薬品として用いるHA-薬物結合体、特に関節疾患治療に適した高分子量のHA-薬物結合体、それを用いた製剤、および当該結合体の合成方法はこれまで知られていなかった。

【特許文献1】 特開平5-39306号

【特許文献2】 国際公開WO94/19376号パンフレット

【特許文献3】 国際公開WO99/59603号パンフレット

【特許文献4】 国際公開WO02/44218号パンフレット

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0019】

発明が解決しようとする課題は、関節疾患治療薬として有用な、ヒアルロン酸-メトトレキサート結合体を提供することである。

【 0 0 2 0 】

【 0 0 2 1 】

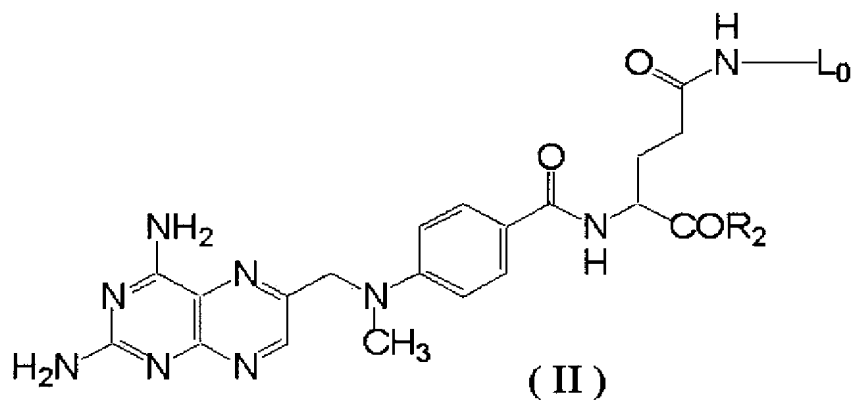
【 0 0 2 2 】

【 0 0 2 3 】

CN1C=NC2=C(N1)N=CN=C2CN(C)Cc3ccc(cc3)C(=O)N[C@@H](CC(=O)N\*)C(=O)OR1

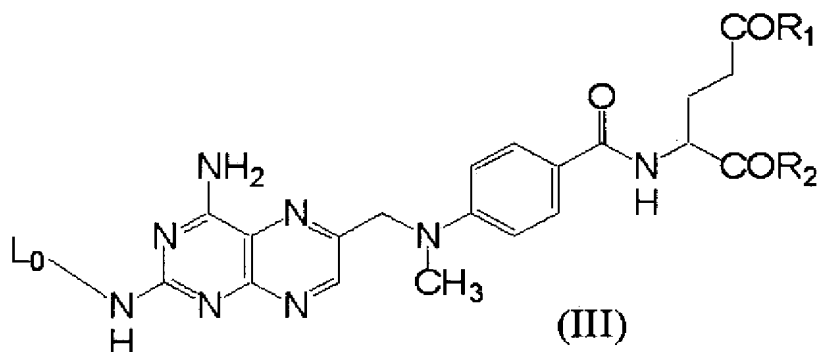
【 0 0 2 4 】

【化2】



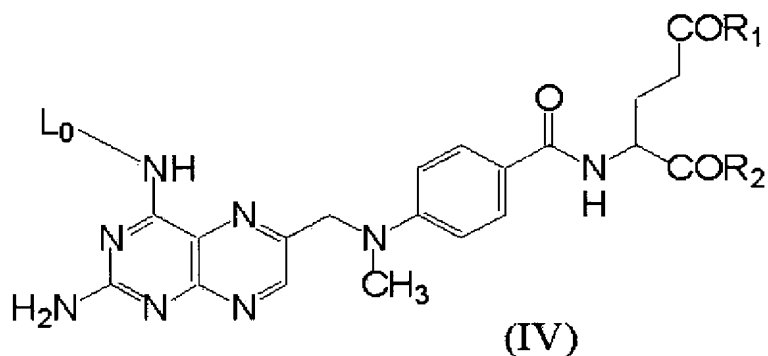
【 0 0 2 5 】

【化3】



【0026】

【化4】



【0027】

【式中、 $R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、 $C_{1-6}$  アルコキシ基、 $C_{1-6}$  アルキルアミノ基、またはジ- $C_{1-6}$  アルキルアミノ基であり； $L_0$  は、リンカーの結合位置である。】

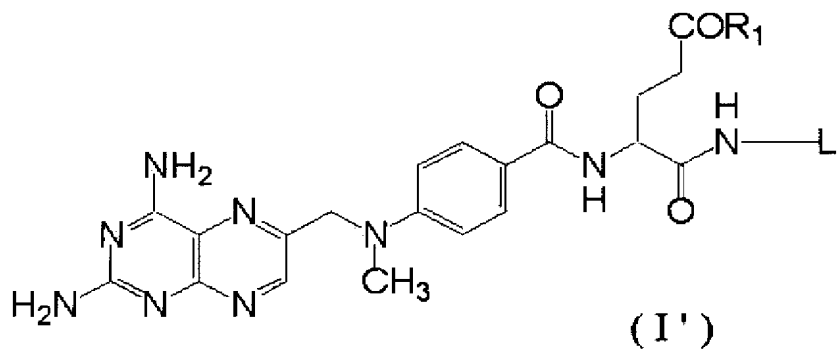
で表される、上記のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体もまた提供される。

【0028】

また、本発明の別の側面により、ペプチド鎖を含有するリンカーおよび当該リンカーに結合したメトトレキサートが、式 (I') または (II') :

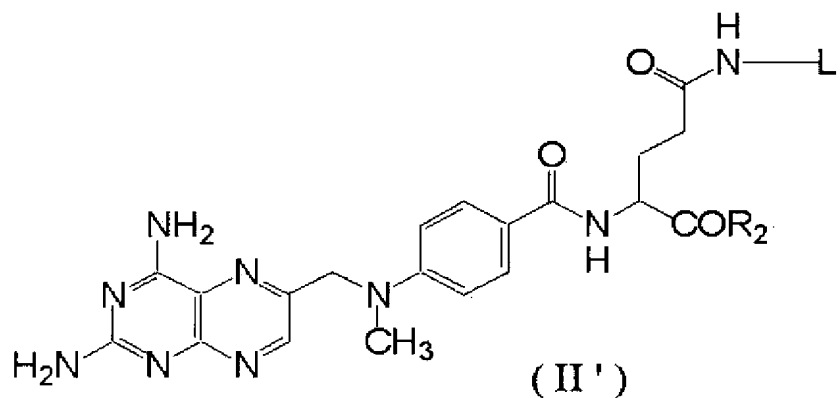
【0029】

【化5】



【0030】

【化6】

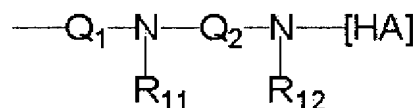


【0031】

〔式中、 $R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、 $C_{1-6}$  アルコキシ基、 $C_{1-6}$  アルキルアミノ基、またはジ- $C_{1-6}$  アルキルアミノ基であり；  
Lは、式(X)

【0032】

【化7】



(X)

【0033】

〔式中、 $Q_1$  は結合する-NH-と一緒にあって1～8個のアミノ酸からなるペプチド鎖を形成し、当該ペプチド鎖に含まれる残基およびアミド結合は $C_{1-6}$  アルキル基、 $C_{1-6}$  アルキルカルボニル基で置換されていてもよく、残基に含まれるカルボキシル基は $C_{1-6}$  アルキル基で置換されていてもよいアミド基に変換されていてもよく；

$R_{11}$  および  $R_{12}$  はそれぞれ独立に水素原子または $C_{1-6}$  アルキル基であり；

$Q_2$  は1～5個の酸素原子が挿入されていてもよくおよび／またはカルボキシル基または $C_{1-6}$  アルコキシカルボニル基で置換されていてもよい $C_{2-20}$  アルキレンであり；および

〔HA〕はヒアルロン酸との結合位置を表し、当該リンカーは当該ヒアルロン酸に含まれるカルボキシル基とアミド結合を形成する。)で表されるリンカーである。〕

で表される、上記のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体が提供される。

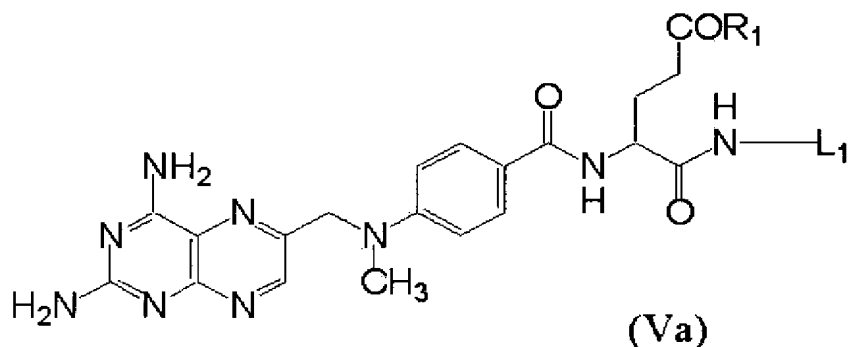
【0034】

さらに本発明のその他の側面によれば、上記ヒアルロン酸-メトトレキサート結合体を有効成分として含有する医薬組成物、および関節疾患治療薬もまた提供される。

さらに本発明の別の側面によれば、上記のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体の製造に利用することができる、式(Va)または(Vb)：

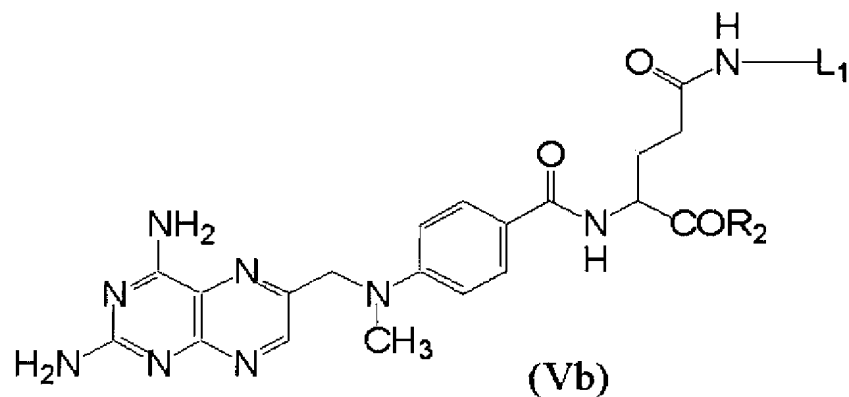
【0035】

【化 8】



【 0 0 3 6 】

【化 9】



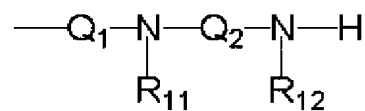
【 0 0 3 7 】

【式中、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基、アミノ基、C<sub>1</sub>—6 アルコキシ基、C<sub>1</sub>—6 アルキルアミノ基、またはジ—C<sub>1</sub>—6 アルキルアミノ基であり；

L<sub>1</sub> は、式 (X')

【 0 0 3 8 】

【化 1 0】



【 0 0 3 9 】

(式中、Q<sub>1</sub> は結合する—NH—と一緒にあって1～8個のアミノ酸からなるペプチド鎖を形成し、当該ペプチド鎖に含まれる残基およびアミド結合はC<sub>1</sub>—6 アルキル基、C<sub>1</sub>—6 アルコキシカルボニル基で置換されていてもよく、当該残基に含まれるカルボキシル基はC<sub>1</sub>—6 アルキルで置換されていてもよいアミド基に変換されていてもよく；

R<sub>11</sub> および R<sub>12</sub> はそれぞれ独立に水素原子またはC<sub>1</sub>—6 アルキルであり；

Q<sub>2</sub> は1～5個の酸素原子が挿入されていてもよくおよび／またはカルボキシル基またはC<sub>1</sub>—6 アルコキシカルボニル基で置換されていてもよいC<sub>2</sub>—20 アルキレンである。)である。]

の化合物が提供される。

【 0 0 4 0 】

さらに本発明の別の側面によれば、上記の式 (V a) または (V b) の化合物をヒアルロン酸と反応させ、当該ヒアルロン酸のカルボキシル基をN—置換アミド基に変換する工

程を含む、上記のヒアルロン酸－メトトレキサート結合体の製造方法もまた提供される。

#### 【0041】

以下本発明の詳細について説明する。

本発明のヒアルロン酸－メトトレキサート結合体（HA－MTX結合体）は新規化合物である。本発明では、ヒアルロン酸（HA）とメトトレキサート（MTX）とを結合させる手段として、HAのカルボキシル基に、ペプチド鎖を含有するリンカーを介してMTXが結合した構造を採用したことにより、HAの疼痛除去作用を保持し、かつ、MTXの滑膜炎軽減作用を併せ持つ。即ち、本発明のHA－MTX結合体は、滑膜に集積した後、滑膜細胞内に取り込まれ、細胞内でMTXの薬効を発現すると考えられる。

#### 【0042】

従って、本発明のHA－MTX結合体をOAもしくはRA患者の膝関節内に投与した場合、従来のHA製剤同様、HAの特性に基づく疼痛除去作用を発現する一方で、滑膜組織に蓄積しながら、徐々に滑膜細胞内に取り込まれ、MTXを解離することにより、滑膜炎抑制作用を持続的に発現する。これにより、経口投与に比べMTXの投与量を大幅に低減することが可能であり、経口投与で問題となる全身性の副作用の懸念を払拭できる。また、投与部位において、HA製剤とMTXの両者は、作用機序の異なる薬理効果を発現し得るので、両者相俟った相乗的な薬効が期待できる。

#### 【0043】

即ち、本発明のHA－MTX結合体により、関節注入剤としてのHAの側面を持ちながら、MTXの滑膜炎抑制作用を投与関節内でのみ安全に発現させることができる、従来にない優れた関節疾患治療薬が提供される。

#### 【0044】

本発明のヒアルロン酸－メトトレキサート結合体（HA－MTX結合体）は、ヒアルロン酸のカルボキシル基に、ペプチド鎖を含有するリンカーを介してメトトレキサートが結合したものである。

#### 【0045】

本発明において「ヒアルロン酸（HA）」とは、特に限定はされないが、例えば平均分子量5万～1000万ダルトンを有する、グルクロン酸とN－アセチルグルコサミンとから成る二糖の重合体である。ヒアルロン酸の塩には、特に限定はされないが、例えばナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩、亜鉛塩、鉄塩、アンモニウム塩、テトラブチルアンモニウム塩などが含まれる。ヒアルロン酸及びその塩、並びにそれらの混合物の具体例には、例えば、商品名 スベニール（商標：製造販売 中外製薬株式会社）；商品名 アルツ（商標：製造 生化学工業株式会社、販売 科研製薬株式会社）；商品名 オベガン（商標：製造 生化学工業株式会社、販売 参天製薬株式会社）などが含まれる。本発明において「ヒアルロン酸誘導体」とは、HAから誘導されるHA骨格を有する物質を意味する。ヒアルロン酸誘導体としては、特に限定はされないが、例えば、HA中の一つ以上のカルボキシル基がエステル化されている物質（例えば、ベンジルエステル化HA（商品名 Hyaff（商標）、Fidia Advanced Biopolymers））、HAをホルムアルデヒドで架橋しさらに高分子化した物質（例えば、商品名 Synvisc（商標）、Biomatrix））、HA中の一つ以上のヒドロキシ基がアセチル化されているアセチル化HA、などを包含する。

#### 【0046】

本発明のHA－MTX結合体は、HAの疼痛除去作用を損なってはならないため、HA－MTX結合体として、臨床での疼痛除去作用が確認されているHAと同等の分子量サイズと粘弾性を保持したものであることが好ましい。また、分子量が大きくなると粘弾性が上がりハンドリングが困難になること、および生体内におけるキャリアとしてのHAの効果を考慮すると、具体的には、HA－MTX結合体としての分子量が60万～600万ダルトンであることが好ましく、HA－MTX結合体としての分子量が80万～600万ダルトンであることがより好ましく、HA－MTX結合体としての分子量が100万～500万ダルトンであることが特に好ましい。



#### 【0047】

ここで、上記した原料HAの分子量、HA-MTX結合体の分子量は、極限粘度から粘度平均分子量を算出する方法で測定したものである。極限粘度（ $[\eta]$ ）から粘度平均分子量（ $M_w$ ）への換算は、以下の式を用いて算出することができる。

$$M_w = ([\eta] / 0.00036) 1.282$$

本発明のペプチド鎖を含有するリンカーにおけるペプチド鎖は、アミノ酸により構成される。当該アミノ酸には、グリシン、アラニン、セリン、プロリン、バリン、トレオニン、システイン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸、リジン、グルタミン、グルタミン酸、メチオニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、アルギニン、チロシン、トリプトファンなどの天然 $\alpha$ -アミノ酸の他に、アルキル側鎖を持つ $\alpha$ -アミノ酸（例えば、ノルバリン、ノルロイシン、 $\epsilon$ -ロイシンなど）、シクロアルキル基で置換されたアラニンやグリシン（例えば、シクロペンチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシンなど）、またはアリール基で置換されたアラニンやグリシン（例えば、ピリジルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン、置換フェニルアラニン、フェニルグリシンなど）などの非天然 $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アラニンなどの $\beta$ -アミノ酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸などの $\gamma$ -アミノ酸、およびタウリンなどのアミノスルホン酸などが含まれる。

#### 【0048】

当該リンカーはアミノ酸のみにより構成されていてもよく、またはペプチド鎖の中または末端にアミノ酸以外の化合物に由来する部分を含んでいてもよい。例えば、アルキレンジアミン、オキサアルキレンジアミンのようなジアミノ化合物やコハク酸のようなジカルボン酸化合物がペプチド鎖の中または末端に結合したものなども当該リンカーに含まれる。ペプチド鎖の中または末端にアミノ酸以外の化合物を含む場合で、当該リンカーがMTXのカルボキシル基とヒアルロン酸のカルボキシル基に結合する場合には、アルキレンジアミン、オキサアルキレンジアミンのようなジアミノ化合物がペプチド鎖の末端に存在することが好ましく、エチレンジアミン、4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンがペプチド鎖の末端に存在することが特に好ましい。また、ペプチド鎖を構成するアミノ酸は特に限定されないが、プロテアーゼに対する親和性の観点から、 $\alpha$ -アミノ酸が好ましく、ペプチド鎖を含有するリンカーのMTXに結合する末端は $\alpha$ -アミノ酸であることが好ましい。

#### 【0049】

当該ペプチド鎖を構成するアミノ酸の数は、特に限定はされないが、典型的には1～8であり、好ましくは1～6であり、特に好ましくは1～4である。当該ペプチド鎖を構成するアミノ酸の残基は $C_{1-6}$ アルキル基および／または $C_{1-6}$ アルキルカルボニル基で置換されていてもよく、例えば当該残基に含まれるカルボキシル基は $C_{1-6}$ アルコキシカルボニル基に、ヒドロキシ基は $C_{1-6}$ アルコキシ基または $C_{1-6}$ アルキルカルボニルオキシ基に、アミノ基は $C_{1-6}$ アルキルアミノ基、ジ $C_{1-6}$ アルキルアミノ基、 $C_{1-6}$ アルキルカルボニルアミノ基または $N-C_{1-6}$ アルキル- $C_{1-6}$ アルキルカルボニルアミノ基にそれぞれ変換されていてもよい。当該ペプチド鎖に含まれるアミド結合も、 $C_{1-6}$ アルキル基および／または $C_{1-6}$ アルキルカルボニル基で置換されていてもよく、例えば $-CON(C_{1-6}アルキル)-$ に変換されていてもよい。

ペプチド鎖を構成するアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、以下のようなものが挙げられる。尚、ターゲットとなる生体内プロテアーゼが存在し、その基質認識アミノ酸配列が既知の場合、その認識部位および／または切断部位を含むアミノ酸配列を用いてもよい。

#### 【0050】

アミノ酸1個からなるペプチド鎖：Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val、など。好ましくは、Phe、Tyr、Ile、Glu。

#### 【0051】

アミノ酸2個からなるペプチド鎖：PhePhe、PheGly、PheLeu、TyrPhe、TrpPhe、PheTrp、PheTyr、GlyPhe、GlyGly、など。好ましくは、PhePhe、PheGly。

#### 【0052】

アミノ酸3個からなるペプチド鎖：PheGlyGly、PheLeuGly、PhePheGly、AsnPhePhe、GlyPhePhe、LeuPhePhe、LeuAlaLeu、AlaValAla、GlyAlaPhe、GlyPheAla、GlyIleAla、GlyIlePhe、GlyLeuAla、GlyValAla、GlyValPhe、GlyGlyGly、など。好ましくは、AsnPhePhe。

#### 【0053】

アミノ酸4個からなるペプチド鎖：GlyPheLeuGly、GlyPhePheLeu、GlyPhePheAla、GlyPheTyrAla、GlyPheGlyPhe、GlyPheGlyGly、GlyGlyPheGly、GlyGlyPheTyr、GlyGlyGlyGly、LeuAlaLeuAla、AlaLeuAlaLeu、AlaGlyValPhe、GluAsnPhePhe、など。好ましくは、GlyPheLeuGly。

#### 【0054】

本発明におけるリンカーは、例えば上記式(X)で示される構造を有していてもよく、その場合Q<sub>1</sub>は結合する-NH-と一緒にあって上述したような1～8個のアミノ酸からなるペプチド鎖を形成する。また、Q<sub>2</sub>は1～5個の酸素原子が挿入されるか、もしくはカルボキシル基またはC<sub>1</sub>-6アルコキシカルボニル基で置換されていてもよいC<sub>2</sub>-20アルキレンである。Q<sub>2</sub>の具体例としては、エタン-1, 2-ジイル基、プロパン-1, 3-ジイル基、ブタン-1, 4-ジイル基、ペンタン-1, 5-ジイル基、ヘキサン-1, 6-ジイル基、ヘプタン-1, 7-ジイル基、オクタン-1, 8-ジイル基、ノナン-1, 9-ジイル基、デカン-1, 10-ジイル基、2-メチルプロパン-1, 3-ジイル基、2-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルペンタン-1, 5-ジイル基、3-エチルペンタン-1, 5-ジイル基、2-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、3-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘプタン-1, 7-ジイル基、3-オキサペンタン-1, 5-ジイル基、3-オキサヘキサン-1, 6-ジイル基、4-オキサヘキサン-1, 6-ジイル基、3-オキサヘプタン-1, 7-ジイル基、4-オキサヘプタン-1, 7-ジイル基、4-オキサオクタン-1, 8-ジイル基、3, 6-ジオキサオクタン-1, 8-ジイル基、3, 6-ジオキサノナン-1, 9-ジイル基、3, 6-ジオキサー4-メチルノナン-1, 9-ジイル基、4, 7-ジオキサデカン-1, 10-ジイル基、4, 9-ジオキサドデカン-1, 12-ジイル基、4, 7, 10-トリオキサトリデカン-1, 13-ジイル基などが挙げられ、好ましくは、エタン-1, 2-ジイル基、ペンタン-1, 5-ジイル基、3-オキサペンタン-1, 5-ジイル基、3, 6-ジオキサオクタン-1, 8-ジイル基、4, 7-ジオキサデカン-1, 10-ジイル基、4, 9-ジオキサドデカン-1, 12-ジイル基、4, 7, 10-トリオキサトリデカン-1, 13-ジイル基などが挙げられる。

#### 【0055】

本発明のHA-MTX結合体は、HAのカルボキシル基に、ペプチド鎖を含有するリンカーを介してMTXが結合するものであればどのような結合様式をとっていてもよい。即ち、ペプチド鎖を含有するリンカーは、

- 1) MTXの $\alpha$ 位のカルボキシル基；
- 2) MTXの $\gamma$ 位のカルボキシル基；および
- 3) MTXのアミノ基と結合しうるものであり、さらにこれらの結合様式が複数混在（例えば、MTXの $\alpha$ 位のカルボキシル基で結合した結合体と、MTXの $\gamma$ 位のカルボキシル基で結合した結合体が混在）していてもよい。しかしながら、プロテアーゼに対する親和性と合成上の観点から、ペプチド鎖を含有するリンカーはMTXの $\alpha$ 位のカルボキシル基

及び／または $\gamma$ 位のカルボキシル基と結合していることが好ましく、当該リンカーはMTXの $\alpha$ 位のカルボキシル基と結合していることがより好ましい。

#### 【0056】

本発明のHA-MTX結合体において、ペプチド鎖を含有するリンカーおよびその結合様式のうち特に好ましいものは、ペプチド鎖を含有するリンカーが $\alpha$ -アミノ酸からなるペプチド鎖の末端にジアミノ化合物が存在するものであり、そのペプチド鎖のN末端がMTXの $\alpha$ 位のカルボキシル基に酸アミド結合によって結合し、そのペプチド鎖のC末端がジアミノ化合物を介してHAのカルボキシル基と酸アミド結合によって結合しているものである。

#### 【0057】

本発明のヒアルロン酸-メトトレキサート結合体におけるメトトレキサート(MTX)部分は、リンカーによる修飾以外に、公知の方法によりプロドラッグ化されていてもよい。

#### 【0058】

本明細書においてC<sub>1</sub>-6アルキル基は、炭素数1~6の直鎖または分枝鎖状のアルキル基を意味し、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、s-ブチル基、i-ブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、3-メチルブチル基、2-メチルブチル基、1-メチルブチル基、1-エチルプロピル基、及びn-ヘキシル基等を含む。

#### 【0059】

本明細書においてC<sub>1</sub>-6アルキルカルボニルは、炭素数1~6の直鎖または分枝鎖状のアルキルカルボニル基を意味し、例えば、アセチル基、プロピオニル基、2-メチルプロピオニル基、2,2-ジメチルプロピオニル基などの既に定義したアルキル基をアルキル部分として有するものが含まれる。

#### 【0060】

本明細書においてC<sub>1</sub>-6アルコキシは、炭素数1~6の直鎖または分枝鎖状のアルコキシ基を意味し、例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基などの既に定義したアルキル基をアルキル部分として有するものが含まれる。

#### 【0061】

本明細書においてC<sub>1</sub>-6アルキルアミノは、炭素数1~6の直鎖または分枝鎖状のアルキルアミノ基を意味し、例えばメチルアミノ基、エチルアミノ基、n-プロピルアミノ基などの既に定義したアルキル基をアルキル部分として有するものが含まれる。

#### 【0062】

本明細書においてジC<sub>1</sub>-6アルキルアミノは、炭素数1~6の直鎖または分枝鎖状のジアルキルアミノ基を意味し、例えばジメチルアミノ基、エチルメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、エチルn-プロピルアミノ基などの、同一または異なってもよい既に定義したアルキル基をアルキル部分として有するものが含まれる。

#### 【0063】

本明細書においてジC<sub>2</sub>-20アルキレンは、炭素数2~20の直鎖または分枝鎖状のアルキレン基を意味し、例えばエチレン基、プロピレン基、ブチレン基、オクチレン基、デカレン基などが含まれる。

#### 【0064】

本明細書においてC<sub>1</sub>-6アルコシカルボニル基は、炭素数1~6の直鎖または分枝鎖状のアルコシカルボニル基を意味し、例えばメトシカルボニル基、エトシカルボニル基、n-プロポシカルボニル基などの既に定義したアルキル基をアルキル部分として有するものが含まれる。

#### 【0065】

本明細書におけるアシル化には、C<sub>1</sub>-6アルキルカルボニル化；およびベンゾイル化などが含まれ、当該ベンゾイル基はC<sub>1</sub>-6アルキル、ハロゲン原子、C<sub>1</sub>-6アルコキシなどで置換されていてもよい。

#### 【0066】

本発明のHA-MTX結合体におけるMTXの結合率は、薬効を発揮し副作用の懸念が無い範囲であることが好ましい。本明細書におけるMTXの結合率は、以下の式：

#### 【0067】

【化11】

$$(\text{MTXの結合率}) = \frac{(\text{分子中に結合するMTX部分の数})}{(\text{分子中のグルクロン酸部分の数})}$$

#### 【0068】

により算出される。MTXの結合率は、特に限定はされないが、薬効発現の観点から0.5%以上が好ましく、1.0%以上がより好ましい。一方で、MTXの作用を投与部分に限局させ、MTXの有する全身性の副作用を低減するためには、結合率は10%より小さいことが好ましい。また、本発明のHA-MTX結合体は、分子量が大きく、かつ、MTXの結合率が高いと不溶化を起こし合成上の不都合が生じることを考慮すると、MTXの結合率は0.5%以上かつ4.5%より小さいことが好ましく、1.0%以上かつ4.5%より小さいことが特に好ましい。

#### 【0069】

本発明のHA-MTX結合体は、塩として存在することもできるが、その用途を考慮すれば薬学上許容可能な塩であることが好ましい。例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩、亜鉛塩、鉄塩、アンモニウム塩、テトラブチルアンモニウム塩などが挙げられる。

#### 【0070】

本発明のHA-MTX結合体の合成にあたっては、HA、ペプチド鎖を含有するリンカー、MTXを適当な順番で結合させることによって得ることができる。例えば、HA-ペプチド鎖を含有するリンカーを構築した後にMTXを導入するルートや、MTX-ペプチド鎖を含有するリンカーを構築した後HAを導入するルートが挙げられる。この各結合反応は、通常の酸アミド結合反応に用いられる溶媒と縮合剤と必要に応じて反応促進性の添加剤を用いて、-20℃～40℃の温度で、数分～数日間反応させることで行える。溶媒としては、例えば、水、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセタミド、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、ジオキサン、メタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルムなど、および、それらの混液が挙げられる。縮合剤としては、例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミドなどのカルボジイミド化合物や、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシートリス(ジメチルアミノ)ホスフォニウムヘキサフルオロホスフェート、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリンなどが挙げられる。反応促進性の添加剤としては、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-カルボキシミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール、3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアゾール、などの活性エステル剤や、トリエチルアミン、N-メチルモルホリン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、トリス[2-(2-メトキシエトキシ)エチル]アミンなどのpH調整剤が挙げられる。反応の際、アミノ酸側鎖等の官能基、例えばヒドロキシ基、カルボキシル基、アミノ基等は、必要に応じて通常の有機合成において汎用される保護基を用いることができる。

#### 【0071】

ここで、HA分子量の低下を防ぐために、コンジュゲート化反応の制御のしやすさの観点からMTX-ペプチド鎖を含有するリンカーを構築した後HAを導入するルートが好ましい。溶媒は水、N,N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、エタノール、お

よび、それらの混液が好ましく、水とテトラヒドロフランの混液が最も好ましく、その混合比率は1：1が最も好ましい。縮合剤は水溶性のものが好ましく、1－エチル－3－（3－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドが最も好ましく、その添加量はHA中のカルボキシル基に対して0.1当量が最も好ましい。反応促進性添加剤は、活性エステル剤としては3，4－ジヒドロ－3－ヒドロキシ－4－オキソ－1，2，3－ベンゾトリアゾールが最も好ましく、その添加量はHA中のカルボキシル基に対して0.1当量が最も好ましい。pH調整剤としてはトリス〔2－（2－メトキシエトキシ）エチル〕アミンが最も好ましく、反応時pHが6～7であることが最も好ましい。また、反応温度は、－10℃～30℃が好ましく、0℃～15℃が最も好ましい。反応時間は、1時間～48時間が好ましく、12時間～24時間が最も好ましい。

#### 【0072】

本発明において「関節疾患」とは、具体的には、関節軟骨欠損、変形性関節症（明らかな原因のない1次性と原因疾患が認められる2次性を含む）、肩関節周囲炎、関節リウマチ、反応性関節炎、ウイルス性関節炎、化膿性関節炎、結核性関節炎、神経性関節症などの疾患を指し、さらに、これら疾患における関節痛（例えば、関節リウマチにおける膝関節痛など）をも包含する。また、「関節疾患治療薬」とは、前記関節疾患の治療に用いられる薬剤だけでなく、予防に用いられる薬剤、病態の進展抑制（悪化の防止や現状維持）等のために用いられる薬剤をも包含する。

#### 【0073】

本発明のHA－MTX結合体は、その有効量に、適宜、製薬上許容しうる担体、賦型剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、香料、着色剤等を加えて医薬組成物として用いることができる。本発明のHA－MTX結合体を有効成分とする医薬組成物は、関節疾患治療薬として用いられることが好ましく、その中でも関節局所投与製剤として用いられることが特に好ましい。

#### 【0074】

本発明のHA－MTX結合体を関節疾患治療薬として製剤化するに際しては、特に限定されないが、例えば、生理食塩水やリン酸生理食塩水等に所望の濃度に溶解させ、注射用製剤として製剤化することができる。この際、必要に応じて、酸又は塩基を加えることにより、溶液を所望のpHに調整してもよい。また、ナトリウム塩、カリウム塩等の1価の金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩等の2価の金属塩等の無機塩等を加えることにより、溶液を所望の塩濃度に調整してもよい。更に、所望に応じて、安定化剤等が加えられていてもよい。このようにして調製された、本発明のHA－MTX結合体を溶解させた溶液を、ディスポーザブル注射筒等の注射器に予め充填させた形で流通させてもよい。本発明のHA－MTX結合体を有効成分とする関節疾患治療薬として投与するに際しては、本発明のHA－MTX結合体が0.01%～10%w/vの溶液濃度、好ましくは0.1%～2.0%w/vの溶液濃度、特に好ましくは0.5%～1.5%w/vの溶液濃度のものを、1回あたり1～3mLを患者に投与すればよい。但し、この投与量は、医師の指示、対象となる患者、又は疾患の種類やその重篤度、或いはHA－MTX結合体の分子量等により、それぞれ最適な投与量に適宜増減してもよい。

#### 【0075】

本発明のHA－MTX結合体は、以下の実施例において説明するとおり、膝関節に病態が発症する関節炎モデルに関節内投与すると、HAには見られない滑膜炎の軽減作用を発現する。さらに本願発明者らは、この滑膜炎の軽減作用は、低分子量（分子量30万ダルトン）のHA－MTX結合体と比して、60万ダルトン以上、特に分子量80万ダルトン以上のHA－MTX結合体に極めて高い効果が確認されることを見出した。

#### 【実施例】

#### 【0076】

本発明を以下の実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0077】

## 【実施例 1-1】

2-【N-【N-【N-【4-【【(2,4-ジアミノ-6-プテリジニル)メチル】メチルアミノ】ベンゾイル】- $\alpha$ -(O5-メチルグルタミル)】フェニルアラニル】フェニルアラニルアミノ】エチルアミン：MTX- $\alpha$ -PhePhe-NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物1)の製造

(a) Cbz-Phe-NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH-Boc (化合物1a)の製造

N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニン (Cbz-Phe：7.16g、25.4mmol)とN-tert-ブトキシカルボニル-エチレンジアミン塩酸塩 (5.00g、25.4mmol)と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (HOBt：4.28g、28.0mmol)とN-メチルモルホリン (NMM：3.07mL、28.0mmol)をジメチルホルムアミド (DMF) 100mLに溶解し、氷冷攪拌下1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC：5.36g、28.0mmol)を加え、室温で1日間攪拌した。反応液に10%クエン酸水溶液を加え、析出した固体をクロロホルムと少量のメタノールに溶かし、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (溶出溶媒 クロロホルム：メタノール=95：5)で精製し、白色固体の標題化合物 9.69gを得た。

【0078】

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz、DMSO-d<sub>6</sub>)： $\delta$  1.37 (9H、s)、2.69-3.19 (6H、m)、4.12-4.22 (1H、m)、4.93 (2H、dd、J=12.9Hz、J=15.1Hz)、6.75 (1H、br. t)、7.22-7.33 (10H、m)、7.48 (1H、d、J=8.6Hz)、8.05 (1H、br. t)  
LC/MS：441.9 (M+H<sup>+</sup>) 464.1 (M+Na<sup>+</sup>)

【0079】

(b) Cbz-PhePhe-NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH-Boc (化合物1b)の製造

化合物1a (9.69g、21.9mmol)をメタノール200mLに溶解し、10%パラジウム炭素500mgを加え、水素雰囲気下室温で1日攪拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣とCbz-Phe (6.92g、23.1mmol)とHOBt (3.71g、24.2mmol)とNMM (2.66mL、24.2mmol)をジメチルホルムアミド (DMF) 50mLに溶解し、氷冷攪拌下EDC (4.64g、24.2mmol)を加え、室温で1日間攪拌した。反応液に水を加え、10%クエン酸水溶液、飽和重曹水、水で洗浄し乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (溶出溶媒 クロロホルム：メタノール=90：10)で精製し、白色固体の標題化合物 12.8gを得た。

【0080】

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz、DMSO-d<sub>6</sub>)： $\delta$  1.37 (9H、s)、2.62-3.18 (8H、m)、4.18-4.29 (1H、m)、4.40-4.51 (1H、m)、4.93 (2H、s)、6.72 (1H、br. t)、7.10-7.32 (15H、m)、7.46 (1H、d、J=8.6Hz)、7.97 (1H、br. t)、8.11 (1H、d、J=7.9Hz)

LC/MS：588.8 (M+H<sup>+</sup>) 611.1 (M+Na<sup>+</sup>)

【0081】

(c) Cbz-Glu(OMe)PhePhe-NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH-Boc (化合物1c)の製造

化合物1b (11.1g、18.9mg)をメタノール800mLとDMF 50mLとTHF 500mLに溶解し、10%パラジウム炭素1.00gを加え、水素雰囲気下室温で1日攪拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣とN-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- $\gamma$ -メチルエステル (Cbz-Glu(OMe)：5.58g、18.9mmol)とHOBt (3.18g、20.8mmol)とNMM (2.29mL、20.8mmol)をDMF 100mLに溶解し、氷冷攪拌下EDC (3.9

9 g、20.8 mmol)を加え、室温で2日間撹拌した。氷冷撹拌下反応液に10%クエン酸を加え生じた沈殿を、5%重曹水、水で洗浄後、シリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1)で精製し、メタノールを加え沈殿を生じさせ白色粉末の標題化合物11.1 gを得た。

【0082】

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz、DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.36 (9H、s)、1.64–1.80 (2H、m)、2.17–2.23 (2H、m)、2.76–3.12 (8H、m)、3.56 (3H、s)、3.93–4.03 (1H、m)、4.40–4.58 (2H、m)、5.00 (2H、s)、6.68 (1H、br. t)、7.18–7.44 (16H、m)、7.84–7.90 (2H、m)、8.19 (1H、d、 $J=7.7$  Hz)

LC/MS: 732.4 ( $M+H^+$ )、754.4 ( $M+Na^+$ )

【0083】

(d) MTX- $\alpha$ -PhePhe-NH- $C_2H_4$ -NH-Boc (化合物1d)の製造  
化合物1c (348 mg、0.476 mmol)をメタノール10 mLとテトラヒドロフラン10 mLに懸濁し、10%パラジウム炭素33 mgを加え、水素雰囲気下室温で1.5時間撹拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣と4-[N-(2,4-ジアミノ-6-プテリジニルメチル)-N-メチルアミノ]安息香酸:197 mg、0.547 mmol)とHOBt (76 mg、0.499 mmol)をN-メチルピロリドン(NMP)4 mLに溶解し、氷冷撹拌下N-メチルモルホリン(NMM、55  $\mu$ L、0.499 mmol)とEDC (105 mg、0.547 mmol)を加え、室温で4日間撹拌した。反応液に5%重曹水を加え生じた沈殿をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1)、続いて、アミンシリカゲル(NH-DM1020、100–200 mesh、富士シリシア化学株式会社製)カラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1)で精製し、黄色粉末の標題化合物362 mgを得た。

【0084】

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz、DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.35 (9H、s)、1.78–1.94 (2H、m)、2.23 (2H、m)、2.69–3.10 (8H、m)、3.22 (3H、s)、3.55 (3H、s)、4.27–4.52 (3H、m)、4.79 (2H、s)、6.63 (2H、br. s)、6.70 (1H、br. t)、6.82 (2H、d、 $J=8.9$  Hz)、7.06–7.25 (10H、m)、7.46 (1H、br. s)、7.66–7.88 (5H、m)、8.06–8.17 (2H、m)、8.56 (1H、s)

LC/MS: 905.5 ( $M+H^+$ )

【0085】

(e) MTX- $\alpha$ -PhePhe-NH- $C_2H_4$ -NH<sub>2</sub> (化合物1)の製造  
化合物1d (360 mg、0.398 mmol)に、氷冷下、トリフルオロ酢酸5 mLを加え1時間撹拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をアミンシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン:メタノール=100:10、2回)で精製し、黄色粉末の標題化合物275 mgを得た。

【0086】

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz、DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.80–1.96 (2H、m)、2.20–2.28 (2H、m)、2.45 (2H、t、 $J=6.6$  Hz)、2.70–3.10 (6H、m)、3.22 (3H、s)、3.55 (3H、s)、4.26–4.52 (3H、m)、4.79 (2H、s)、6.61 (2H、br. s)、6.82 (2H、d、 $J=8.7$  Hz)、7.06–7.21 (10H、m)、7.46 (1H、br. s)、7.65–7.73 (3H、m)、7.85 (1H、d、 $J=8.1$  Hz)、8.08–8.16 (2H、m)、8.56 (1H、s)

LC/MS: 805.3 ( $M+H^+$ )

【0087】

【実施例1-2】

4, 7, 10-トリオキサー-13-[N-[N-[N-[4-[[(2, 4-ジアミノ-6-プテリジニル)メチル]メチルアミノ]ベンゾイル]- $\alpha$ -(5-メチルグルタミル)]]フェニルアラニル]フェニルアラニルアミノ]トリデカニルアミン:MTX- $\alpha$ -PhePhe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物2)の製造

(a) Cbz-Phe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH-Boc (化合物2a)の製造

N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニン (Cbz-Phe: 852 mg、2.85 mmol) と N-tert-ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサー-1, 13-トリデカンジアミン (760 mg、2.37 mmol) と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (HOBt: 363 mg、2.37 mmol) をジメチルホルムアミド (DMF) 6 mL に溶解し、氷冷撹拌下 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC: 546 mg、2.85 mmol) を加え、室温で2日間撹拌した。反応液に酢酸エチルを加え、10%クエン酸水溶液、5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (溶出溶媒 ジクロロメタン: メタノール=100:3) で精製し、油状の標題化合物 1.35 g を得た。

【0088】

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz、CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.43 (9H、s)、1.56-1.74 (4H、m)、3.06 (2H、d、J=6.8 Hz)、3.17-3.58 (16H、m)、4.30-4.39 (1H、m)、4.98 (1H、br)、5.08 (2H、s)、5.50 (1H、br)、6.40 (1H、br)、7.16-7.32 (10H、m)

LC/MS: 624.3 (M+Na<sup>+</sup>)

【0089】

(b) Cbz-PhePhe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH-Boc (化合物2b)の製造

化合物2a (1.35 g、2.24 mmol) をメタノール 12 mL に溶解し、10%パラジウム炭素 200 mg を加え、水素雰囲気下室温で4時間撹拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣と Cbz-Phe (1.07 g、3.57 mmol) と HOBt (514 mg、3.36 mmol) を DMF 10 mL に溶解し、氷冷撹拌下 EDC (688 mg、3.59 mmol) を加え、室温で2日間撹拌した。反応液に酢酸エチルを加え、10%クエン酸水溶液、5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (溶出溶媒 ジクロロメタン: メタノール=100:3) で精製した。n-ヘキサンを加えると白色沈殿物を生じ、ろ取して標題化合物 1.56 g を得た。

【0090】

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz、CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.43 (9H、s)、1.60-1.78 (4H、m)、2.96-3.60 (20H、m)、4.42-4.59 (2H、m)、4.96-5.07 (3H、m)、5.41 (1H、br. d)、6.39 (1H、br)、6.73 (1H、br. d)、7.08-7.31 (15H、m)

LC/MS: 771.3 (M+Na<sup>+</sup>)

【0091】

(c) Cbz-Glu(OMe)PhePhe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH-Boc (化合物2c)の製造

化合物2b (500 mg、0.668 mmol) をメタノール 10 mL に溶解し、10%パラジウム炭素 150 mg を加え、水素雰囲気下室温で1日撹拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣と N-カルボベンゾキシ-L-グルタミン酸- $\gamma$ -メチルエステル (Cbz-Glu(OMe): 217 mg、0.734 mmol) と HOBt (102 mg、0.668 mmol) を DMF 5 mL に溶解し、氷冷撹拌下 EDC



(141 mg、0.734 mmol)を加え、室温で16時間攪拌した。反応液に酢酸エチルを加え、10%クエン酸水溶液、5%重曹水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン：メタノール=100：5)で精製した。n-ヘキサンを加えると白色沈殿物を生じ、ろ取して標題化合物529 mgを得た。

【0092】

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  1.36 (9H、s)、1.50–1.85 (6H、m)、2.20 (2H、t、 $J=7.9$  Hz)、2.70–3.10 (8H、m)、3.25–3.48 (12H、m)、3.56 (3H、s)、3.93–4.02 (1H、m)、4.20–4.60 (2H、m)、5.00 (2H、s)、6.77 (1H、br. t)、7.10–7.45 (16H、m)、7.82 (1H、br. t、 $J=6.1$  Hz)、7.91 (1H、d、 $J=7.9$  Hz)、8.22 (1H、d、 $J=7.9$  Hz)

LC/MS : 914.3 (M+Na $^+$ )

【0093】

(d) MTX- $\alpha$ -PhePhe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH-Boc (化合物2d)の製造

化合物2c (514 mg、0.576 mmol)をメタノール30 mLに懸濁し、10%パラジウム炭素100 mgを加え、水素雰囲気下室温で1.5時間攪拌した。反応混合物より触媒をろ別後、減圧濃縮した。この残渣と4-[N-(2,4-ジアミノ-6-ブテリジニルメチル)-N-メチルアミノ]安息香酸：281 mg、0.864 mmol)とHOBt (132 mg、0.864 mmol)をDMF 5 mLに溶解し、氷冷攪拌下EDC (166 mg、0.864 mmol)を加え、室温で2日間攪拌した。反応液に5%重曹水を加え生じた沈殿をアミンシリカゲル(NH-DM1020、100–200 mesh、富士シリシア化学株式会社製)カラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 1回目、ジクロロメタン：メタノール=100：7、2回目、クロロホルム：メタノール=100：4)で精製し、黄色粉末の標題化合物415 mgを得た。

【0094】

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  1.36 (9H、s)、1.48–1.61 (4H、m)、1.81–1.92 (2H、m)、2.24 (2H、t、 $J=7.9$  Hz)、2.70–3.10 (8H、m)、3.22 (3H、s)、3.25–3.47 (12H、m)、3.54 (3H、s)、4.25–4.50 (3H、m)、4.79 (2H、s)、6.61 (2H、br. s)、6.76–6.83 (3H、m)、7.06–7.24 (10H、m)、7.45 (1H、br. s)、7.67–7.80 (4H、m)、7.86 (1H、d、 $J=8.1$  Hz)、8.09 (1H、d、 $J=7.4$  Hz)、8.15 (1H、d、 $J=8.1$  Hz)、8.56 (1H、s)

LC/MS : 1087.5 (M+Na $^+$ )

【0095】

(e) MTX- $\alpha$ -PhePhe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物2)の製造  
化合物2d (413 mg、0.388 mmol)に、氷冷下、トリフルオロ酢酸3 mLを加え40分間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をアミンシリカゲルカラムクロマトグラフィ(溶出溶媒 ジクロロメタン：メタノール=100：7、2回)で精製し、黄色粉末の標題化合物344 mgを得た。

【0096】

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  1.49–1.95 (4H、m)、1.81–1.92 (2H、m)、2.24 (2H、t、 $J=7.9$  Hz)、2.70–3.10 (8H、m)、3.22 (3H、s)、3.25–3.47 (12H、m)、3.54 (3H、s)、4.25–4.50 (3H、m)、4.79 (2H、s)、6.61 (2H、br. s)、6.76–6.83 (3H、m)、7.06–7.24 (10H、m)、7.45 (1H、br. s)、7.83 (1H、br. t、 $J=5.8$  Hz)

、8.01 (1H、d、J=7.9 Hz)、8.09 (1H、d、J=7.1 Hz)、8.15 (1H、d、J=7.8 Hz)、8.56 (1H、s)

LC/MS: 965.5 (M+H<sup>+</sup>)

【0097】

【実施例1-3】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物3)の製造

実施例1-2と同様の方法で、N- $\epsilon$ -トキシカルボニル-4,7,10-トリオキサー1,13-トリデカンジアミンの代わりにN- $\epsilon$ -トキシカルボニル-4,9-ジオキサー1,12-ドデカンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物221mgを得た。

【0098】

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.47-1.60 (8H、m)、1.80-1.95 (2H、m)、2.20-2.29 (2H、m)、2.60 (2H、t)、2.70-3.10 (6H、m)、3.22 (3H、s)、3.25-3.50 (8H、m)、3.54 (3H、s)、4.25-4.49 (3H、m)、4.79 (2H、s)、6.60 (2H、br. s)、6.81 (2H、d、J=8.4 Hz)、7.06-7.20 (10H、m)、7.45 (1H、br. s)、7.65 (1H、br. s)、7.70 (2H、d)、7.73 (1H、br. t)、7.83 (1H、d)、8.10 (1H、d)、8.11 (1H、d)、8.55 (1H、s)

LC/MS: 949.5 (M+H<sup>+</sup>)

【0099】

【実施例1-4】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NH-C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物4)の製造

実施例1-2と同様の方法で、N- $\epsilon$ -トキシカルボニル-4,7,10-トリオキサー1,13-トリデカンジアミンの代わりにN- $\epsilon$ -トキシカルボニル-4,7-ジオキサー1,10-デカンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物407mgを得た。

【0100】

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.50-1.57 (4H、m)、1.85-1.91 (2H、m)、2.21-2.28 (2H、m)、2.60 (2H、t)、2.70-3.13 (6H、m)、3.22 (3H、s)、3.25-3.45 (8H、m)、3.55 (3H、s)、4.27-4.49 (3H、m)、4.79 (2H、s)、6.60 (2H、br. s)、6.82 (2H、d、J=8.8 Hz)、7.07-7.21 (10H、m)、7.43 (1H、br. s)、7.69 (1H、br. s)、7.71 (2H、d、J=8.8 Hz)、7.75 (1H、br. t)、7.85 (1H、d)、8.08 (1H、d)、8.13 (1H、d)、8.56 (1H、s)

LC/MS: 921.4 (M+H<sup>+</sup>)

【0101】

【実施例1-5】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NH-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物5)の製造

実施例1-2と同様の方法で、N- $\epsilon$ -トキシカルボニル-4,7,10-トリオキサー1,13-トリデカンジアミンの代わりにN- $\epsilon$ -トキシカルボニル-3,6-ジオキサー1,8-オクタンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物148mgを得た。

【0102】

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.81-1.91 (2H、m)、2.20-2.25 (2H、m)、2.61-2.64 (2H、t)、2.70-2.97 (6H、m)、3.22 (3H、s)、3.27-3.47 (8H、m)、3.55 (3H、s)、4.27-4.47 (3H、m)、4.79 (2H、s)、6.62 (2H、br. s)、6.82 (2H、d、J=8.7 Hz)、7.06-7.25 (10H、m)、7.46 (1H、br. s)、7.67 (1H、br. s)、7.71 (2H、d、J=8.6 Hz)、7.85 (1H、d)、7.92 (1H、br. t)、8.07

(1H、d)、8.15 (1H、d)、8.56 (1H、s)

LC/MS: 893.6 (M+H<sup>+</sup>)

【0103】

【実施例1-6】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NH-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O-NH<sub>2</sub> (化合物6) の製造

実施例1-2と同様の方法で、N- $\epsilon$ -トクトキシカルボニル-4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミンの代わりにN- $\epsilon$ -トクトキシカルボニル-3-オキサ-1,5-ペンタンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物52mgを得た。

【0104】

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz、DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.84-1.92 (2H、m)、2.20-2.27 (2H、m)、2.60-2.64 (2H、t)、2.71-2.99 (6H、m)、3.22 (3H、s)、3.25-3.45 (4H、m)、3.54 (3H、s)、4.27-4.50 (3H、m)、4.79 (2H、s)、6.61 (2H、br. s)、6.81 (2H、d、J=8.4Hz)、7.05-7.21 (10H、m)、7.45 (1H、br. s)、7.65 (1H、br. s)、7.70 (2H、d、J=8.6Hz)、7.84 (1H、d)、7.91 (1H、br. t)、8.07 (1H、d)、8.15 (1H、d)、8.55 (1H、s)

LC/MS: 849.4 (M+H<sup>+</sup>)

【0105】

【実施例1-7】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NH-C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物7) の製造

実施例1-1と同様の方法で、N- $\epsilon$ -トクトキシカルボニル-1,2-エチレンジアミンの代わりにN- $\epsilon$ -トクトキシカルボニル-1,5-ペンタンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物148mgを得た。

【0106】

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz、DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.16-1.56 (6H、m)、1.81-1.97 (2H、m)、2.21-2.29 (2H、m)、2.69-3.06 (6H、m)、3.23 (3H、s)、3.55 (3H、s)、4.25-4.50 (3H、m)、4.80 (2H、s)、6.65 (2H、br. s)、6.82 (2H、d、J=8.6Hz)、7.08-7.24 (10H、m)、7.50 (1H、br. s)、7.60-7.89 (5H、m)、8.10-8.16 (2H、m)、8.55 (1H、s)

LC/MS: 847.4 (M+H<sup>+</sup>)

【0107】

【実施例1-8】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-Lys-OMe (化合物8) の製造

実施例1-2と同様の方法で、N- $\epsilon$ -トクトキシカルボニル-4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミンの代わりにN- $\epsilon$ -トクトキシカルボニル-L-リジンメチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物178mgを得た。

【0108】

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz、DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.25-1.34 (4H、m)、1.56-1.69 (2H、m)、1.75-1.90 (2H、m)、2.18-2.25 (2H、br. t)、2.50-2.60 (2H、m)、2.65-3.07 (4H、m)、3.22 (3H、s)、3.54 (3H、s)、3.60 (3H、s)、4.15-4.60 (4H、m)、4.79 (2H、s)、6.63 (2H、br. s)、6.81 (2H、d、J=8.7Hz)、7.00-7.25 (10H、m)、7.45 (1H、br. s)、7.62 (1H、br. s)、7.69 (2H、d、J=8.6Hz)、7.80 (1H、d)、8.05 (1H、d)、8.16 (1H、d)、8.30 (1H、d)、8.56 (1H、s)

LC/MS: 905.4 (M+H<sup>+</sup>)

【0109】

【実施例1-9】

MTX- $\alpha$ -PheGly-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>（化合物9）の製造

実施例1-2（a）の工程のN-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシグリシンを用いた以外は、実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物528mgを得た。

【0110】

<sup>1</sup>H-NMR（270MHz、DMSO-d<sub>6</sub>）： $\delta$  1.51-1.64（4H、m）、1.84-1.94（2H、m）、2.21-2.30（2H、m）、2.55（2H、t、J=6.3Hz）、2.78-2.92（1H、m）、3.03-3.76（17H、m）、3.22（3H、s）、3.55（3H、s）、4.26-4.52（2H、m）、4.79（2H、s）、6.63（2H、br.s）、6.82（2H、d、J=8.7Hz）、7.11-7.24（5H、m）、7.47（1H、br.s）、7.62-7.72（4H、m）、8.04-8.16（2H、m）、8.28（1H、br.t）、8.56（1H、s）

LC/MS：875.5（M+H<sup>+</sup>）

【0111】

【実施例1-10】

MTX- $\alpha$ -PheGly-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>（化合物10）の製造

実施例1-9と同様の方法で、N- $\alpha$ -ブトキシカルボニル-4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミンの代わりにN- $\alpha$ -ブトキシカルボニル-4,9-ジオキサ-1,12-トリデカンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物300mgを得た。

【0112】

<sup>1</sup>H-NMR（400MHz、DMSO-d<sub>6</sub>）： $\delta$  1.47-1.50（4H、m）、1.54-1.60（4H、m）、1.82-1.95（2H、m）、2.25-2.28（2H、m）、2.58（2H、t、J=6.6Hz）、2.82-2.87（1H、m）、3.02-3.07（3H、m）、3.22（3H、s）、3.25-3.41（8H、m）、3.55（3H、s）、3.55-3.63（2H、m）、4.28-4.47（2H、m）、4.79（2H、s）、6.60（2H、br.s）、6.81（2H、d、J=8.8Hz）、7.09-7.18（5H、m）、7.45（1H、br.s）、7.59（1H、br.t）、7.66（1H、br.s）、7.70（2H、d、J=8.8Hz）、8.02（1H、d）、8.08（1H、d）、8.26（1H、br.t）、8.56（1H、s）

LC/MS：859.3（M+H<sup>+</sup>）

【0113】

【実施例1-11】

MTX- $\alpha$ -PheGly-NH-C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>（化合物11）の製造

実施例1-9と同様の方法で、N- $\alpha$ -ブトキシカルボニル-4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミンの代わりにN- $\alpha$ -ブトキシカルボニル-4,7-ジオキサ-1,10-デカンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物300mgを得た。

【0114】

<sup>1</sup>H-NMR（400MHz、DMSO-d<sub>6</sub>）： $\delta$  1.53-1.62（4H、m）、1.82-1.92（2H、m）、2.20-2.27（2H、m）、2.50-2.60（2H、t）、2.81-2.86（1H、m）、2.97-3.08（3H、m）、3.22（3H、s）、3.25-3.47（8H、m）、3.55（3H、s）、3.55-3.73（2H、m）、4.24-4.47（2H、m）、4.79（2H、s）、6.60（2H、br.s）、6.81（2H、d）、7.12-7.21（5H、m）、7.45（1H、br.s）、7.60（1H、br.t）、7.63（1H、br.s）、7.69（2H、d）、8.03（1H、d）、8.10（1H、d）、8.

2.8 (1H, br. t)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 831.3 (M+H<sup>+</sup>)

【0115】

【実施例1-12】

MTX- $\alpha$ -PheGly-NH-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物12)の製造

実施例1-9と同様の方法で、N-tertブトキシカルボニル-4,7,10-トリオキサー1,13-トリデカンジアミンの代わりにN-tertブトキシカルボニル-3,6-ジオキサー1,8-オクタンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物181mgを得た。

【0116】

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.83-1.92 (2H, m)、2.21-2.27 (2H, m)、2.60-2.65 (2H, t)、2.75-3.10 (2H, m)、3.22 (3H, s)、3.23-3.46 (10H, m)、3.55 (3H, s)、3.55-3.75 (2H, m)、4.25-4.52 (2H, m)、4.79 (2H, s)、6.61 (2H, br. s)、6.82 (2H, d, J=8.6Hz)、7.10-7.20 (5H, m)、7.45 (1H, br. s)、7.63-7.72 (4H, m)、8.00 (1H, d)、8.10 (1H, d)、8.27 (1H, br. t)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 803.4 (M+H<sup>+</sup>)

【0117】

【実施例1-13】

MTX- $\alpha$ -PheGly-NH-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O-NH<sub>2</sub> (化合物13)。

【0118】

実施例1-9と同様の方法で、N-tertブトキシカルボニル-4,7,10-トリオキサー1,13-トリデカンジアミンの代わりにN-tertブトキシカルボニル-3-オキサー1,5-ペンタンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物318mgを得た。

【0119】

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.82-1.95 (2H, m)、2.22-2.27 (2H, m)、2.59-2.64 (2H, t)、2.73-3.15 (2H, m)、3.23 (3H, s)、3.25-3.38 (6H, m)、3.55 (3H, s)、3.46-3.77 (2H, m)、4.23-4.51 (2H, m)、4.79 (2H, s)、6.62 (2H, br. s)、6.82 (2H, d, J=8.6Hz)、7.10-7.17 (5H, m)、7.47 (1H, br. s)、7.63-7.75 (4H, m)、8.02 (1H, d)、8.11 (1H, d)、8.27 (1H, br. t)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 759.3 (M+H<sup>+</sup>)

【0120】

【実施例1-14】

MTX- $\alpha$ -PhePro-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物14)の製造

実施例1-2(a)の工程でN-カルボベンゾキシー-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシー-L-プロリンを用いた以外は、実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物382mgを得た。

【0121】

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.49-2.03 (10H, m)、2.19-2.30 (2H, m)、2.55 (2H, t, J=6.6Hz)、2.62-3.69 (21H, m)、3.55 (3H, s)、4.28-4.38 (1H, m)、4.63-4.75 (1H, m)、4.79 (2H, s)、6.60 (2H, br. s)、6.82 (2H, d, J=8.6Hz)、7.14-7.29 (5H, m)、7.47 (1H, br. s)、7.66-7.72 (4H, m)、7.94-8.10 (2H, m)、8.56 (1H, s)

LC/MS: 915.3 (M+H<sup>+</sup>)

【0122】

【実施例1-15】

MTX- $\alpha$ -Phe $\beta$ Ala-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>（化合物15）の製造  
実施例1-2（a）の工程でN-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ- $\beta$ -アラニンを用いた以外は、実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物180mgを得た。

【0123】

<sup>1</sup>H-NMR（270MHz、DMSO-d<sub>6</sub>）： $\delta$  1.52-1.62（4H、m）、1.78-1.95（2H、m）、2.16-2.22（4H、m）、2.56（2H、t、J=7.3Hz）、2.71-3.48（21H、m）、3.55（3H、s）、4.10（2H、br. s）、4.21-4.30（1H、m）、4.38-4.49（1H、m）、4.80（2H、s）、6.59（2H、br. s）、6.83（2H、d、J=8.6Hz）、7.10-7.21（5H、m）、7.43（1H、br. s）、7.65-7.74（3H、m）、7.83-7.89（2H、m）、7.96（1H、br. t）、8.08（1H、d、J=6.8Hz）、8.56（1H、s）

LC/MS：889.5（M+H<sup>+</sup>）

【0124】

【実施例1-16】

MTX- $\alpha$ -Phe $\beta$ Ala-NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>（化合物16）の製造  
実施例1-1（a）の工程でN-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ- $\beta$ -アラニンを用いた以外は、実施例1-1と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物194mgを得た。

【0125】

<sup>1</sup>H-NMR（270MHz、DMSO-d<sub>6</sub>）： $\delta$  1.80-1.94（2H、m）、2.18-2.26（4H、m）、2.54（2H、t、J=6.1Hz）、2.74-3.08（6H、m）、3.23（3H、s）、3.55（3H、s）、4.24-4.48（2H、m）、4.80（2H、s）、6.59（2H、br. s）、6.83（2H、d、J=8.4Hz）、7.13（5H、s）、7.45（1H、br. s）、7.65-7.86（5H、m）、7.96（1H、br. t）、8.09（1H、d、J=6.8Hz）、8.56（1H、s）

LC/MS：729.3（M+H<sup>+</sup>）

【0126】

【実施例1-17】

MTX- $\alpha$ -Phe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>（化合物17）の製造  
実施例1-2（b）の工程を省略した以外は実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物496mgを得た。

【0127】

<sup>1</sup>H-NMR（300MHz、DMSO-d<sub>6</sub>）： $\delta$  1.49-1.59（4H、m）、1.82-1.89（2H、m）、2.19-2.27（2H、m）、2.55（2H、t、J=7.2Hz）、2.73-3.10（4H、m）、3.23（3H、s）、3.17-3.48（12H、m）、3.55（3H、s）、4.21-4.28（1H、m）、4.38-4.45（1H、m）、4.80（2H、s）、6.61（2H、br. s）、6.83（2H、d、J=9.3Hz）、7.11-7.20（5H、m）、7.46（1H、br. s）、7.66（1H、br. s）、7.73（2H、d、J=9.0Hz）、7.83（1H、t）、7.92（1H、d、J=8.4Hz）、8.12（1H、d、J=7.5Hz）、8.56（1H、s）

LC/MS：818.4（M+H<sup>+</sup>）

【0128】

【実施例1-18】

MTX- $\alpha$ -Ile-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>（化合物18）の製造

実施例 1-17 と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-フェニルアラニンの代わりに N-カルボベンゾキシー-L-イソロイシンを用いて、黄色粉末の標題化合物 562 mg を得た。

【0129】

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  0.76-0.80 (6H、m)、0.99-1.10 (1H、m)、1.36-1.45 (1H、m)、1.49-1.73 (5H、m)、1.88-2.07 (2H、m)、2.33-2.38 (2H、m)、2.55 (2H、t、 $J=6.6\text{ Hz}$ )、2.98-3.48 (14H、m)、3.21 (3H、s)、3.56 (3H、s)、4.05-4.13 (1H、m)、4.40-4.48 (1H、m)、4.78 (2H、s)、6.60 (2H、br. s)、6.82 (2H、d、 $J=8.4\text{ Hz}$ )、7.46 (1H、br. s)、7.66-7.72 (3H、m)、7.98 (1H、br. t)、8.12 (1H、d、 $J=7.6\text{ Hz}$ )、8.56 (1H、s)

LC/MS : 784.4 ( $M+H^+$ )

【0130】

【実施例 1-19】

MTX- $\alpha$ -Ile-NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物 19)

実施例 1-18 と同様の方法で、N-t-ブトキシカルボニル-4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミンの代わりに N-t-ブトキシカルボニル-1,2-エチレンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物 320 mg を得た。

【0131】

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  0.76-0.80 (6H、m)、0.96-1.08 (1H、m)、1.34-1.48 (1H、m)、1.62-1.70 (1H、m)、1.85-2.03 (2H、m)、2.36 (2H、t、 $J=7.8\text{ Hz}$ )、2.95-3.08 (2H、m)、3.21 (3H、s)、3.56 (3H、s)、4.06-4.12 (1H、m)、4.38-4.45 (1H、m)、4.78 (2H、s)、6.61 (2H、br. s)、6.83 (2H、d、 $J=9.0\text{ Hz}$ )、7.43 (1H、br. s)、7.64-7.72 (4H、m)、7.92 (1H、t、 $J=5.7\text{ Hz}$ )、8.12 (1H、d、 $J=7.5\text{ Hz}$ )、8.57 (1H、s)。

LC/MS : 624.2 ( $M+H^+$ )

【0132】

【実施例 1-20】

MTX- $\alpha$ -Glu(OMe)-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物 20) の製造

実施例 1-17 と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-フェニルアラニンの代わりに N-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸-γ-メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物 600 mg を得た。

【0133】

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  1.50-2.03 (8H、m)、2.24-2.31 (2H、t)、2.34-2.40 (2H、t)、2.49-2.57 (2H、t)、2.97-3.52 (14H、m)、3.21 (3H、s)、3.53 (3H、s)、3.55 (3H、s)、4.15-4.36 (2H、m)、4.78 (2H、s)、6.61 (2H、br. s)、6.81 (2H、d、 $J=8.7\text{ Hz}$ )、7.46 (1H、br. s)、7.67 (1H、br. s)、7.72 (2H、d、 $J=8.6\text{ Hz}$ )、7.84 (1H、br. t)、7.95 (1H、d)、8.14 (1H、d)、8.55 (1H、s)

LC/MS : 814.4 ( $M+H^+$ )

【0134】

【実施例 1-21】

MTX- $\alpha$ -Glu(OMe)-NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物 21) の製造

実施例 1-20 と同様の方法で、N-tert-ブトキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンの代わりに N-tert-ブトキシカルボニル-1, 2-エチレンジアミンを用いて、黄色粉末の標題化合物 283 mg を得た。

【0135】

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  1.71-2.09 (4H、m)、2.28 (2H、t、 $J=7.6$  Hz)、2.39 (2H、t、 $J=7.6$  Hz)、2.53 (2H、t、 $J=6.1$  Hz)、2.99-3.05 (2H、m)、3.21 (3H、s)、3.54 (3H、s)、3.56 (3H、s)、4.14-4.36 (2H、m)、4.79 (2H、s)、6.61 (2H、br. s)、6.82 (2H、d、 $J=8.6$  Hz)、7.43 (1H、br. s)、7.65-7.79 (4H、m)、7.95 (1H、d、 $J=7.8$  Hz)、8.14 (1H、d、 $J=6.9$  Hz)、8.56 (1H、s)

LC/MS : 654.1 (M+H<sup>+</sup>)

【0136】

【実施例 1-22】

MTX- $\alpha$ -Tyr-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物 22) の製造

実施例 1-17 と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-フェニルアラニンの代わりに N-カルボベンゾキシー-L-チロシンを用いて、黄色粉末の標題化合物 133 mg を得た。

【0137】

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  1.51-1.62 (4H、m)、1.85-1.95 (2H、m)、2.23-2.31 (2H、m)、2.51-2.58 (2H、t)、2.63-2.91 (2H、m)、2.95-3.16 (2H、m)、3.22 (3H、s)、3.27-3.54 (12H、m)、3.56 (3H、s)、4.22-4.35 (2H、m)、4.79 (2H、s)、6.57 (2H、d、 $J=8.1$  Hz)、6.61 (2H、br. s)、6.82 (2H、d、 $J=8.7$  Hz)、6.92 (2H、d、 $J=8.1$  Hz)、7.47 (1H、br. s)、7.67-7.88 (5H、m)、8.13 (1H、d)、8.55 (1H、s)

LC/MS : 834.4 (M+H<sup>+</sup>)

【0138】

【実施例 1-23】

MTX- $\alpha$ -Trp-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物 23) の製造

実施例 1-17 と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-フェニルアラニンの代わりに N-カルボベンゾキシー-L-トリプトファンを用いて、黄色粉末の標題化合物 171 mg を得た。

【0139】

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  1.50-1.61 (4H、m)、1.84-1.97 (2H、m)、2.23-2.32 (2H、m)、2.50-2.56 (2H、t)、2.92-3.15 (4H、m)、3.22 (3H、s)、3.29-3.45 (12H、m)、3.55 (3H、s)、4.29-4.49 (2H、m)、4.78 (2H、s)、6.64 (2H、br. s)、6.80 (2H、d)、6.92 (1H、t)、7.04 (1H、t)、7.10 (1H、s)、7.26 (1H、d)、7.44 (1H、br. s)、7.51 (1H、d)、7.65 (1H、br. s)、7.69 (2H、d)、7.82 (1H、br. t)、7.93 (1H、d)、8.10 (1H、d)、8.55 (1H、s)、10.80 (1H、s)

LC/MS : 857.5 (M+H<sup>+</sup>)

【0140】

【実施例 1-24】

MTX- $\alpha$ -Ser-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物 24) の製造

実施例 1-17 と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-フェニルアラニンの代わ



りにN-カルボベンゾキシーL-セリンを用いて、黄色粉末の標題化合物416mgを得た。

【0141】

$^1\text{H-NMR}$  (300MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  1.50–1.63 (4H、m)、1.90–2.08 (4H、m)、2.39 (2H、t、 $J=7.8\text{Hz}$ )、2.55 (2H、t、 $J=6.6\text{Hz}$ )、3.05–3.48 (16H、m) 3.21 (3H、s)、3.56 (3H、s)、4.13–4.20 (1H、m)、4.33–4.41 (1H、m)、4.78 (2H、s)、6.61 (2H、br. s)、6.82 (2H、d、 $J=9.0\text{Hz}$ )、7.44 (1H、br. s)、7.66–7.80 (5H、m)、8.19 (1H、d、 $J=6.9\text{Hz}$ )、8.56 (1H、s)

LC/MS : 758.4 ( $M+H^+$ )

【0142】

【実施例1-25】

MTX- $\alpha$ -Leu-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物25) の製造

実施例1-17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシーL-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシーL-ロイシンを用いて、黄色粉末の標題化合物283mgを得た。

【0143】

$^1\text{H-NMR}$  (270MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  0.80–0.87 (6H、d)、1.43–1.64 (7H、m)、1.90–2.06 (2H、m)、2.34–2.30 (2H、t)、2.53–2.58 (2H、t)、3.04–3.08 (2H、m)、3.21 (3H、s)、3.33–3.47 (12H、m)、3.56 (3H、s)、4.19–4.37 (2H、m)、4.78 (2H、s)、6.62 (2H、br. s)、6.82 (2H、d、 $J=8.7\text{Hz}$ )、7.45 (1H、br. s)、7.64–7.85 (5H、m)、8.10 (1H、d)、8.55 (1H、s)

LC/MS : 784.4 ( $M+H^+$ )

【0144】

【実施例1-26】

MTX- $\alpha$ -Val-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物26) の製造

実施例1-17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシーL-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシーL-バリンを用いて、黄色粉末の標題化合物590mgを得た。

【0145】

$^1\text{H-NMR}$  (270MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  0.79 (6H、d、 $J=6.8\text{Hz}$ )、1.52–1.59 (4H、m)、1.85–2.04 (3H、m)、2.33–2.35 (2H、t)、2.56–2.58 (2H、t)、2.93–3.55 (14H、m)、3.21 (3H、s)、3.56 (3H、s)、4.03–4.08 (1H、m)、4.42–4.47 (1H、m)、4.78 (2H、s)、6.62 (2H、br. s)、6.82 (2H、d、 $J=8.7\text{Hz}$ )、7.45 (1H、br. s)、7.61–7.72 (4H、m)、7.98 (1H、br. t)、8.13 (1H、d)、8.56 (1H、s)

LC/MS : 770.4 ( $M+H^+$ )

【0146】

【実施例1-27】

MTX- $\alpha$ -His-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物27) の製造

実施例1-17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシーL-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシーL-ヒスチジンをを用いて、黄色粉末の標題化合物81mgを得た。

【0147】

$^1\text{H-NMR}$  (300MHz、DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  1.49–1.58 (4H、m)

、1. 90–2. 04 (2H、m)、2. 39 (2H、t、J=6. 6 Hz)、2. 55 (2H、t、J=6. 9 Hz)、2. 83 (2H、m)、3. 02 (2H、m)、3. 16–3. 47 (12H、m)、3. 23 (3H、s)、3. 57 (3H、s)、4. 22 (1H、m)、4. 32 (1H、m)、4. 80 (2H、s)、6. 61 (2H、br. s)、6. 72 (1H、s)、6. 84 (2H、d、J=8. 4 Hz)、7. 10–7. 70 (5H、m)、7. 77 (2H、d、J=8. 7 Hz)、8. 36 (1H、br)、8. 57 (1H、s)

LC/MS: 808. 3 (M+H<sup>+</sup>)

【0148】

【実施例1–28】

MTX- $\alpha$ -Pro-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物28) の製造

実施例1–17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシー-L-プロリンを用いて、黄色粉末の標題化合物683mgを得た。

【0149】

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  1. 58 (4H、dd、J=6. 5 Hz、J=12. 8 Hz)、1. 69–2. 10 (6H、m)、2. 44 (2H、t、J=7. 7 Hz)、2. 60 (2H、t、J=6. 8 Hz)、2. 91–3. 75 (19H、m)、3. 57 (3H、s)、4. 18–4. 25 (1H、m)、4. 61–4. 72 (1H、m)、4. 77 (2H、s)、6. 61 (2H、br. s)、6. 80 (2H、d、J=8. 7 Hz)、7. 44 (1H、br. s)、7. 69–7. 80 (4H、m)、8. 15 (1H、d、J=7. 1 Hz)、8. 55 (1H、s)

LC/MS: 768. 3 (M+H<sup>+</sup>)

【0150】

【実施例1–29】

MTX- $\alpha$ - $\beta$ Ala-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物29) の製造

実施例1–17と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシー- $\beta$ -アラニンを用いて、黄色粉末の標題化合物230mgを得た。

【0151】

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  1. 49–1. 62 (4H、m)、1. 79–2. 02 (2H、m)、2. 21 (2H、t、J=6. 9 Hz)、2. 32 (2H、t、J=7. 3 Hz)、2. 56 (2H、t、J=6. 6 Hz)、3. 00–3. 61 (19H、m)、3. 55 (3H、s)、4. 29–4. 38 (1H、m)、4. 78 (2H、s)、6. 61 (2H、br. s)、6. 81 (2H、d、J=8. 6 Hz)、7. 43 (1H、br. s)、7. 61–7. 91 (3H、m)、7. 72 (2H、d、J=8. 6 Hz)、8. 02 (1H、d、J=7. 8 Hz)、8. 55 (1H、s)

LC/MS: 742. 4 (M+H<sup>+</sup>)

【0152】

【実施例1–30】

MTX- $\gamma$ -PhePhe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物30) の製造

実施例1–2と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸- $\gamma$ -メチルエステルの代わりにN-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸- $\alpha$ -メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物312mgを得た。

【0153】

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  1. 49–1. 60 (4H、m)、1. 76–1. 98 (2H、m)、2. 09–2. 20 (2H、m)、2. 56 (2H、t、J=6. 6 Hz)、2. 62–3. 16 (6H、m)、3. 21 (3H、s)、3. 27–3. 48 (12H、m)、3. 59 (3H、s)、4. 27–4. 53 (3H、m)、4. 78 (2H、s)、6. 61 (2H、br. s)、6. 81 (2H、d、J=

8. 6 H z)、7. 16-7. 23 (10 H、m)、7. 48 (1 H、b r. s)、7. 68-7. 74 (3 H、m)、7. 83 (1 H、b r. t)、8. 01 (1 H、d、J = 7. 9 H z)、8. 10 (1 H、d、J = 7. 8 H z)、8. 36 (1 H、d、J = 6. 8 H z)、8. 55 (1 H、s)

LC/MS: 965. 5 (M+H<sup>+</sup>)

【0154】

【実施例1-31】

MTX-γ-PhePhe-NH-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物31)の製造

実施例1-5と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸-γ-メチルエステルの代わりにN-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸-α-メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物80mgを得た。

【0155】

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1. 75-1. 97 (2 H、m)、2. 08-2. 17 (2 H、m)、2. 59-2. 62 (2 H、t)、2. 58-3. 05 (6 H、m)、3. 22 (3 H、s)、3. 15-3. 52 (8 H、m)、3. 59 (3 H、s)、4. 23-4. 52 (3 H、m)、4. 78 (2 H、s)、6. 63 (2 H、b r. s)、6. 81 (2 H、d、J = 8. 7 H z)、7. 11-7. 21 (10 H、m)、7. 44 (1 H、b r. s)、7. 65 (1 H、b r. s)、7. 70 (2 H、d)、7. 94-8. 12 (3 H、m)、8. 35 (1 H、d)、8. 55 (1 H、s)

LC/MS: 893. 5 (M+H<sup>+</sup>)

【0156】

【実施例1-32】

MTX-γ-PhePhe-NH-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O-NH<sub>2</sub> (化合物32)の製造

実施例1-6と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸-γ-メチルエステルの代わりにN-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸-α-メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物49mgを得た。

【0157】

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1. 73-1. 97 (2 H、m)、2. 08-2. 18 (2 H、m)、2. 60-2. 65 (2 H、t)、2. 59-3. 02 (6 H、m)、3. 21 (3 H、s)、3. 13-3. 44 (4 H、m)、3. 59 (3 H、s)、4. 25-4. 53 (3 H、m)、4. 78 (2 H、s)、6. 63 (2 H、b r. s)、6. 81 (2 H、d、J = 8. 7 H z)、7. 09-7. 25 (10 H、m)、7. 43 (1 H、b r. s)、7. 66 (1 H、b r. s)、7. 72 (2 H、d、J = 8. 4 H z)、7. 95-8. 10 (3 H、m)、8. 36 (1 H、d)、8. 55 (1 H、s)

LC/MS: 849. 5 (M+H<sup>+</sup>)

【0158】

【実施例1-33】

MTX-γ-PheGly-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物33)の製造

実施例1-9と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸-γ-メチルエステルの代わりにN-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸-α-メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物693mgを得た。

【0159】

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1. 50-1. 68 (4 H、m)、1. 80-2. 02 (2 H、m)、2. 12-2. 27 (2 H、m)、2. 55 (2 H、t、J = 6. 4 H z)、2. 71-2. 79 (1 H、m)、2. 96-3. 14 (3 H、m)、3. 22 (3 H、s)、3. 38-3. 74 (12 H、m)、3. 59 (3 H、s)、4. 28-4. 48 (2 H、m)、4. 79 (2 H、s)、6. 62 (2 H、b r. s)、6. 81 (2 H、d、J = 8. 4 H z)、7. 14-7. 28 (5 H、m)、7. 47 (1 H、b r. s)、7. 63-7. 73 (4 H、m)、8. 19 (1 H、d、J

= 7.6 Hz)、8.29-8.36 (2H、m)、8.56 (1H、s)

LC/MS: 875.4 (M+H<sup>+</sup>)

【0160】

【実施例 1-34】

MTX- $\gamma$ -Phe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物 34) の製造

実施例 1-17 と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸- $\gamma$ -メチルエステルの代わりに N-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸- $\alpha$ -メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物 480 mg を得た。

【0161】

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.49-1.58 (4H、m)、1.79-2.00 (2H、m)、2.10-2.27 (2H、m)、2.55 (2H、t、J=6.9 Hz)、2.69-2.93 (2H、m)、2.96-3.12 (2H、m)、3.22 (3H、s)、3.26-3.48 (12H、m)、3.59 (3H、s)、4.25-4.33 (1H、m)、4.38-4.46 (1H、m)、4.79 (2H、s)、6.62 (2H、br. s)、6.81 (2H、d、J=8.7 Hz)、7.10-7.24 (5H、m)、7.44 (1H、br)、7.70 (1H、br)、7.72 (2H、d、J=8.7 Hz)、7.95 (1H、t)、8.10 (1H、d、J=8.1 Hz)、8.35 (1H、d、J=6.9 Hz)、8.56 (1H、s)

LC/MS: 818.4 (M+H<sup>+</sup>)

【0162】

【実施例 1-35】

MTX- $\gamma$ -Glu(OMe)-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物 35) の製造

実施例 1-20 と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸- $\gamma$ -メチルエステルの代わりに N-カルボベンゾキシー-L-グルタミン酸- $\alpha$ -メチルエステルを用いて、黄色粉末の標題化合物 438 mg を得た。

【0163】

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.52-2.06 (8H、m)、2.22-2.30 (4H、m)、2.53-2.58 (2H、t)、3.03-3.15 (2H、m)、3.22 (3H、s)、3.25-3.54 (12H、m)、3.56 (3H、s)、3.61 (3H、s)、4.13-4.40 (2H、m)、4.79 (2H、s)、6.63 (2H、br. s)、6.81 (2H、d、J=8.6 Hz)、7.44 (1H、br. s)、7.67 (1H、br. s)、7.72 (2H、d、J=8.4 Hz)、7.90 (1H、br. t)、7.99 (1H、d)、8.37 (1H、d)、8.56 (1H、s)

LC/MS: 814.5 (M+H<sup>+</sup>)

【0164】

【実施例 1-36】

MTX- $\alpha$ -D-Phe-D-Phe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物 36) の製造

実施例 1-2 と同様の方法で、N-カルボベンゾキシー-L-フェニルアラニンの代わりに N-カルボベンゾキシー-D-フェニルアラニンを用いて、黄色粉末の標題化合物 313 mg を得た。

【0165】

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz、DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.40-1.59 (4H、m)、1.74-1.83 (2H、m)、2.04-2.11 (2H、m)、2.56-2.58 (2H、t)、2.59-3.12 (6H、m)、3.21 (3H、s)、3.17-3.51 (12H、m)、3.55 (3H、s)、4.24-4.44 (3H、m)、4.78 (2H、s)、6.62 (2H、br. s)、6.81 (2H、d、J=8.6 Hz)、7.10-7.26 (10H、m)、7.45 (2H、m)、7.64 (1H、

b r . s ) 、 7 . 7 2 ( 2 H 、 d 、 J = 8 . 4 H z ) 、 8 . 1 8 ( 2 H 、 m ) 、 8 . 4 3 ( 1 H 、 d ) 、 8 . 5 5 ( 1 H 、 s )

LC/MS : 965.6 (M+H<sup>+</sup>)

【0166】

【実施例1-37】

MTX- $\gamma$ -D-Phe-D-Phe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物37) の製造

実施例1-30と同様の方法で、N-カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンの代わりにN-カルボベンゾキシ-D-フェニルアラニンを用いて、黄色粉末の標題化合物85mgを得た。

【0167】

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz、DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  1.51-1.61 (4H、m)、1.74-2.02 (2H、m)、2.11-2.16 (2H、m)、2.54-2.59 (2H、t)、2.62-3.12 (6H、m)、3.22 (3H、s)、3.25-3.53 (12H、m)、3.60 (3H、s)、4.31-4.46 (3H、m)、4.79 (2H、s)、6.61 (2H、b r . s ) 、 6 . 8 1 ( 2 H 、 d 、 J = 8 . 6 H z ) 、 7 . 0 8 - 7 . 2 6 ( 1 0 H 、 m ) 、 7 . 4 4 ( 1 H 、 b r . s ) 、 7 . 6 6 - 7 . 7 7 ( 4 H 、 m ) 、 8 . 0 6 ( 2 H 、 m ) 、 8 . 3 6 ( 1 H 、 d ) 、 8 . 5 6 ( 1 H 、 s )

LC/MS : 965.6 (M+H<sup>+</sup>)

【0168】

【実施例1-38】

MTX- $\alpha$ -Asn-Phe-Phe-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物38) の製造

通常のペプチド合成法に従ってペプチド鎖を伸張し、実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の標題化合物145mgを得た。

【0169】

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz、DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  1.52-1.59 (4H、m)、1.87-2.02 (2H、m)、2.32-3.48 (24H、m)、3.22 (3H、s)、3.55 (3H、s)、4.24-4.56 (4H、m)、4.79 (2H、s)、6.60 (2H、b r . s ) 、 6 . 8 1 ( 2 H 、 d 、 J = 8 . 6 H z ) 、 7 . 0 4 - 7 . 7 5 ( 1 7 H 、 m ) 、 8 . 0 7 - 8 . 2 6 ( 4 H 、 m ) 、 8 . 5 6 ( 1 H 、 s )

LC/MS : 1079.5 (M+H<sup>+</sup>)

【0170】

【実施例1-39】

MTX- $\alpha/\gamma$ -Gly-Phe-Leu-Gly-NH-C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (化合物39) の製造

通常のペプチド合成法に従ってペプチド鎖を伸張し、実施例1-2と同様の方法で、黄色粉末の化合物723mgを得た。LC/MS解析により、精製過程で異性化を生じ $\alpha/\gamma$ の混合物 ( $\alpha:\gamma=3:1$ ) となっていること (化合物39) を確認した。

LC/MS : 1045.7 (M+H<sup>+</sup>)

【0171】

【実施例2-1】

MTX- $\alpha$ -Phe-Phe-NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HAの製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500mg、分子量：約230万) にテトラヒドロフラン (THF) (10ml) を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン (HOObt) (0.125mmol) 及び実施例1-1で得られた化合物1 (0.031mmol) を超純水とTHFの等量混合液 (20ml) に溶解した液を添加した後、トリス [2-(2-メトキシエトキシ)エチル] アミン (0.094mmol) を超純水とTHFの等量混合液 (10ml) に溶解した液を添

加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから30分後に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(0.125mmol)を超純水(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて20時間攪拌した。この反応液に、0.09Nの水酸化ナトリウム水溶液(220ml)を添加し、5℃にて3.5時間攪拌した。この溶液に1Nの塩酸(20ml)を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム(9g)を超純水(45ml)に溶解した液を添加したのち、エタノール(600ml)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水(40ml)に溶解し、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約195万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、2.1%であった。

#### 【0172】

この水溶液に、塩化ナトリウム(6g)を超純水(160mL)に溶解した液を添加したのち、エタノール(400mL)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水(500mL)に溶解し、塩化ナトリウム(15g)を添加したのち、0.45μmのフィルター(ステリベックスHV：ミリポア)でろ過し、以後無菌的にろ液にエタノール(1000mL)を滴下してエタノール析出を行い、析出物をろ取し真空乾燥した。この析出物をリン酸緩衝液(2mMリン酸ナトリウム、154mM塩化ナトリウム、pH7.2)(40mL)に溶解し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約186万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、2.1%であった。

#### 【0173】

$^1\text{H-NMR}$  (500MHz、 $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  1.83 (m)、2.01 (br. s)、2.13 (m)、2.49 (m)、2.68 (m)、2.95 (m)、3.35 (br. s)、3.51 (br. s)、3.56 (br. s)、3.71 (br. s)、3.82 (br. s)、4.16 (t)、4.46 (br. s)、4.54 (br. d)、4.88 (d)、4.99 (d)、6.63 (d)、6.87-7.11 (m)、7.73 (d)、8.69 (s)

#### 【0174】

##### 【実施例2-2】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg、分子量：約230万)と実施例1-1で得られた化合物1(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約228万、MTXの結合率は1.9%であった。

#### 【0175】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約218万、MTXの結合率は1.9%であった。

#### 【0176】

$^1\text{H-NMR}$  (500MHz、 $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  1.84 (m)、2.01 (br. s)、2.13 (m)、2.49 (t)、2.68 (m)、2.95 (m)、3.36 (br. d)、3.51 (br. d)、3.56 (br. s)、3.71 (br. s)、3.83 (br. s)、4.16 (t)、4.46 (br. d)、4.55 (br. d)、4.88 (d)、4.98 (d)、6.63 (d)、6.87-7.13 (m)、7.74 (d)、8.70 (s)

#### 【0177】

##### 【実施例2-2'】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HAの製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約 230 万）と実施例 1-1 で得られた化合物 1（0.031mmol）を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 219 万、MTX の結合率は 2.2% であった。

【0178】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 206 万、MTX の結合率は 2.3% であった。

【0179】

$^1\text{H-NMR}$ （500MHz、 $\text{D}_2\text{O}$ ）： $\delta$  1.83（m）、2.01（br.s）、2.14（m）、2.52（m）、2.70（m）、2.96（m）、3.35（br.s）、3.51（br.s）、3.57（br.s）、3.71（br.s）、3.83（br.s）、4.16（t）、4.46（br.s）、4.55（br.s）、4.87（d）、4.97（d）、6.66（d）、6.88-7.09（m）、7.72（d）、8.69（s）

【0180】

【実施例 2-3】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HA の製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約 230 万）にテトラヒドロフラン（THF）（10ml）を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシー-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン（HOObt）（0.125mmol）及び実施例 1-1 で得られた化合物 1（0.008mmol）を超純水と THF の等量混合液（20ml）に溶解した液を添加した後、トリス【2-（2-メトキシエトキシ）エチル】アミン（0.118mmol）を超純水と THF の等量混合液（10ml）に溶解した液を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから 30 分後に 1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（EDC）（0.125mmol）を超純水（10ml）に溶解した液を添加し、5℃にて 20 時間攪拌した。この反応液に、0.09N の水酸化ナトリウム水溶液（220ml）を添加し、5℃にて 3.5 時間攪拌した。この溶液に 1N の塩酸（20ml）を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム（9g）を超純水（45ml）に溶解した液を添加したのち、エタノール（600ml）を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水（40ml）に溶解し、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約 232 万であった。また、得られた結合体の MTX の結合率は、紫外吸収（259nm）を測定することにより算出したところ、0.6% であった。

【0181】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 217 万、MTX の結合率は 0.5% であった。

【0182】

$^1\text{H-NMR}$ （500MHz、 $\text{D}_2\text{O}$ ）： $\delta$  2.01（br.s）、2.52（m）、2.69（m）、2.95（m）、3.34（br.d）、3.51（br.s）、3.57（br.s）、3.71（br.s）、3.83（br.s）、4.16（t）、4.46（br.s）、4.55（br.s）、6.66（d）、6.87-7.10（m）、7.72（d）、8.69（s）

【0183】

【実施例 2-4】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HA の製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約 230 万）にテトラヒドロフラン（THF）（10ml）を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシー-3,4-ジヒドロ-4-オ

キソー 1, 2, 3-ベンゾトリアジン (HOOBt) (0.125 mmol) 及び実施例 1-1 で得られた化合物 1 (0.015 mmol) を超純水と THF の等量混合液 (20 ml) に溶解した液を添加した後、トリス [2-(2-メトキシエトキシ) エチル] アミン (0.110 mmol) を超純水と THF の等量混合液 (10 ml) に溶解した液を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから 30 分後に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (0.125 mmol) を超純水 (10 ml) に溶解した液を添加し、5℃にて 20 時間攪拌した。この反応液に、0.09 N の水酸化ナトリウム水溶液 (220 ml) を添加し、5℃にて 3.5 時間攪拌した。この溶液に 1 N の塩酸 (20 ml) を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム (9 g) を超純水 (45 ml) に溶解した液を添加したのち、エタノール (600 ml) を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水 (40 ml) に溶解し、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約 232 万であった。また、得られた結合体の MTX の結合率は、紫外吸収 (259 nm) を測定することにより算出したところ、1.1 % であった。

#### 【0184】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 223 万、MTX の結合率は 1.1 % であった。

#### 【0185】

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1.84 (m)、2.01 (br. s)、2.13 (m)、2.52 (m)、2.70 (m)、2.96 (m)、3.35 (br. s)、3.51 (br. s)、3.57 (br. s)、3.71 (br. s)、3.83 (br. s)、4.16 (t)、4.46 (br. s)、4.55 (br. s)、6.66 (d)、6.88-7.09 (m)、7.72 (d)、8.69 (s)

#### 【0186】

##### 【実施例 2-5】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HA の製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg, 分子量: 約 230 万) にテトラヒドロフラン (THF) (10 ml) を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソー 1, 2, 3-ベンゾトリアジン (HOOBt) (0.125 mmol) 及び実施例 1-1 で得られた化合物 1 (0.020 mmol) を超純水と THF の等量混合液 (20 ml) に溶解した液を添加した後、トリス [2-(2-メトキシエトキシ) エチル] アミン (0.105 mmol) を超純水と THF の等量混合液 (10 ml) に溶解した液を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから 30 分後に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (0.125 mmol) を超純水 (10 ml) に溶解した液を添加し、5℃にて 20 時間攪拌した。この反応液に、0.09 N の水酸化ナトリウム水溶液 (220 ml) を添加し、5℃にて 3.5 時間攪拌した。この溶液に 1 N の塩酸 (20 ml) を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム (9 g) を超純水 (45 ml) に溶解した液を添加したのち、エタノール (600 ml) を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水 (40 ml) に溶解し、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約 227 万であった。また、得られた結合体の MTX の結合率は、紫外吸収 (259 nm) を測定することにより算出したところ、1.4 % であった。

#### 【0187】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 209 万、MTX の結合率は 1.3 % であった。

#### 【0188】



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1.84 (m)、2.01 (br. s)、2.13 (m)、2.49 (t)、2.68 (m)、2.95 (m)、3.36 (br. s)、3.51 (br. s)、3.56 (br. s)、3.71 (br. s)、3.83 (br. s)、4.16 (t)、4.46 (br. s)、4.55 (br. d)、4.88 (d)、4.98 (d)、6.63 (d)、6.87–7.13 (m)、7.74 (d)、8.70 (s)

【0189】

#### 【実施例 2-6】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HA の製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg, 分子量: 約 230 万) にテトラヒドロフラン (THF) (10 ml) を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン (HOObt) (0.125 mmol) 及び実施例 1-1 で得られた化合物 1 (0.063 mmol) を超純水と THF の等量混合液 (20 ml) に溶解した液を添加した後、トリス [2-(2-メトキシエトキシ) エチル] アミン (0.063 mmol) を超純水と THF の等量混合液 (10 ml) に溶解した液を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから 30 分後に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (0.125 mmol) を超純水 (10 ml) に溶解した液を添加し、5℃にて 20 時間攪拌した。この反応液に、0.09 N の水酸化ナトリウム水溶液 (220 ml) を添加し、5℃にて 3.5 時間攪拌した。この溶液に 1 N の塩酸 (20 ml) を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム (9 g) を超純水 (45 ml) に溶解した液を添加したのち、エタノール (600 ml) を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水 (40 ml) に溶解し、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約 205 万であった。また、得られた結合体の MTX の結合率は、紫外吸収 (259 nm) を測定することにより算出したところ、3.9% であった。

【0190】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 191 万、MTX の結合率は 3.8% であった。

【0191】

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1.84 (m)、2.02 (br. s)、2.15 (m)、2.53 (t)、2.70 (m)、2.96 (m)、3.35 (br. s)、3.51 (br. s)、3.57 (br. s)、3.71 (br. s)、3.83 (br. s)、4.16 (t)、4.46 (br. s)、4.55 (br. s)、4.89 (s)、4.96 (d)、6.66 (d)、6.87–7.10 (m)、7.72 (d)、8.68 (s)

【0192】

#### 【実施例 2-7】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HA の製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg, 分子量: 約 230 万) にテトラヒドロフラン (THF) (10 ml) を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン (HOObt) (0.125 mmol) 及び実施例 1-1 で得られた化合物 1 (0.125 mmol) を超純水と THF の等量混合液 (20 ml) に溶解した液を添加した後、超純水と THF の等量混合液 (10 ml) を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから 30 分後に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (0.125 mmol) を超純水 (10 ml) に溶解した液を添加し、5℃にて 20 時間攪拌した。この反応液に、0.09 N の水酸化ナトリウム水溶液 (220 ml) を添加し、5℃にて 3.5 時間攪拌した。この溶液に 1 N の塩酸 (20 ml) を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム (9 g)

を超純水（45 ml）に溶解した液を添加したのち、エタノール（600 ml）を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水（40 ml）に溶解し、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約197万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収（259 nm）を測定することにより算出したところ、4.5%であった。

#### 【0193】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約174万、MTXの結合率は4.4%であった。

#### 【0194】

$^1\text{H-NMR}$ （500 MHz、 $\text{D}_2\text{O}$ ）： $\delta$  1.83 (m)、1.93 (m)、2.02 (br. s)、2.14 (m)、2.53 (t)、2.69 (m)、2.95 (m)、3.35 (br. s)、3.51 (br. s)、3.57 (br. s)、3.71 (br. s)、3.83 (br. s)、4.16 (t)、4.46 (br. s)、4.55 (br. d)、4.87 (d)、4.95 (d)、6.67 (d)、6.87-7.10 (m)、7.71 (d)、8.68 (s)

#### 【0195】

##### 【実施例2-8】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500 mg、分子量：約230万）と実施例1-2で得られた化合物2（0.031 mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約211万、MTXの結合率は1.6%であった。

#### 【0196】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約198万、MTXの結合率は1.4%であった。

#### 【0197】

##### 【実施例2-9】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500 mg、分子量：約230万）と実施例1-3で得られた化合物3（0.031 mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約183万、MTXの結合率は1.8%であった。

#### 【0198】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約155万、MTXの結合率は1.7%であった。

#### 【0199】

##### 【実施例2-10】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500 mg、分子量：約230万）と実施例1-4で得られた化合物4（0.031 mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約189万、MTXの結合率は1.6%であった。

#### 【0200】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約162万、MTXの結合率は1.6%であった。

### 【0201】

#### 【実施例2-11】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg，分子量：約230万）と実施例1-5で得られた化合物5（0.031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約192万、MTXの結合率は1.9%であった。

### 【0202】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約162万、MTXの結合率は2.0%であった。

### 【0203】

<sup>1</sup>H-NMR（500MHz、D<sub>2</sub>O）： $\delta$  1.77-1.85（m）、2.02（br. s）、2.16-2.24（m）、2.51（m）、2.66（m）、2.92（m）、3.00（m）、3.35（br. s）、3.51（br. s）、3.57（br. s）、3.72（br. s）、3.83（br. s）、4.20（m）、4.46（br. s）、4.55（br. s）、6.68（d）、6.95-7.18（m）、7.76（d）、8.72（s）

### 【0204】

#### 【実施例2-12】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>ONH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg，分子量：約230万）と実施例1-6で得られた化合物6（0.031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約172万、MTXの結合率は2.0%であった。

### 【0205】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約149万、MTXの結合率は1.9%であった。

### 【0206】

<sup>1</sup>H-NMR（500MHz、D<sub>2</sub>O）： $\delta$  1.77-1.84（m）、2.01（br. s）、2.20-2.28（m）、2.49（m）、2.64（m）、2.93（m）、3.00（m）、3.35（br. s）、3.52（br. s）、3.58（br. s）、3.73（br. s）、3.83（br. s）、4.20（t）、4.47（br. s）、4.55（br. s）、4.92（d）、5.06（d）、6.64（d）、6.94-7.19（m）、7.77（d）、8.73（s）

### 【0207】

#### 【実施例2-13】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg，分子量：約230万）と実施例1-7で得られた化合物7（0.031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約214万、MTXの結合率は1.4%であった。

### 【0208】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約196万、MTXの結合率は1.2%であった。

### 【0209】

#### 【実施例2-14】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-Lys-HAの製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約 230 万）と実施例 1-8 で得られた化合物 8（0.031mmol）を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 189 万、MTX の結合率は 1.4% であった。

#### 【0210】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 172 万、MTX の結合率は 1.4% であった。

#### 【0211】

##### 【実施例 2-15】

MTX- $\alpha$ -Phe Gly-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約 80 万）と実施例 1-2 で得られた化合物 2（0.031mmol）を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 83 万、MTX の結合率は 1.4% であった。

#### 【0212】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 80 万、MTX の結合率は 1.4% であった。

#### 【0213】

##### 【実施例 2-16】

MTX- $\alpha$ -Phe Gly-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約 80 万）にテトラヒドロフラン（THF）（10ml）を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシー-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン（HOObt）（0.125mmol）及び実施例 1-2 で得られた化合物 2（0.009mmol）を超純水と THF の等量混合液（20ml）に溶解した液を添加した後、トリス〔2-（2-メトキシエトキシ）エチル〕アミン（0.116mmol）を超純水と THF の等量混合液（10ml）に溶解した液を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから 30 分後に 1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（EDC）（0.125mmol）を超純水（10ml）に溶解した液を添加し、5℃にて 20 時間攪拌した。この反応液に、0.09N の水酸化ナトリウム水溶液（220ml）を添加し、5℃にて 3.5 時間攪拌した。この溶液に 1N の塩酸（20ml）を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム（9g）を超純水（45ml）に溶解した液を添加したのち、エタノール（600ml）を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を大塚生理食塩水（40mL）に溶解し、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約 83 万であった。また、得られた結合体の MTX の結合率は、紫外吸収（259nm）を測定することにより算出したところ、0.5% であった。

#### 【0214】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 81 万、MTX の結合率は 0.5% であった。

#### 【0215】

##### 【実施例 2-17】

MTX- $\alpha$ -Phe Gly-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約 80 万）にテトラヒドロフラン（THF）（10ml）を加えた懸濁液に、3-ヒドロキシー-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン（HOObt）（0.125mmol）及び実施例 1-2 で得られた化合物 2（0.125mmol）を超純水と THF の等量混合液（20ml）

1) に溶解した液を添加した後、超純水とTHFの等量混合液(10ml)を添加し、5℃にて攪拌した。攪拌を開始してから30分後に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(0.125mmol)を超純水(10ml)に溶解した液を添加し、5℃にて20時間攪拌した。この反応液に、0.09Nの水酸化ナトリウム水溶液(220ml)を添加し、5℃にて3.5時間攪拌した。この溶液に1Nの塩酸(20ml)を添加することにより中和し、さらに塩化ナトリウム(9g)を超純水(45ml)に溶解した液を添加したのち、エタノール(600ml)を滴下してエタノール析出を行い、析出物を遠心分離により分離した。析出物を超純水(40ml)に溶解し、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。ヒアルロン酸を標準物質とするゲルろ過法により求めた分子量は約77万であった。また、得られた結合体のMTXの結合率は、紫外吸収(259nm)を測定することにより算出したところ、3.4%であった。

#### 【0216】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約76万、MTXの結合率は3.4%であった。

#### 【0217】

##### 【実施例2-18】

MTX- $\alpha$ -PheGly-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg、分子量：約230万)と実施例1-9で得られた化合物9(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約199万、MTXの結合率は1.5%であった。

#### 【0218】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約186万、MTXの結合率は1.4%であった。

#### 【0219】

<sup>1</sup>H-NMR(500MHz、D<sub>2</sub>O)： $\delta$  1.59(m)、1.78(m)、1.90-1.95(m)、2.02(br.s)、2.13-2.23(m)、2.99-3.14(m)、3.28(s)、3.35(br.s)、3.51(br.s)、3.57(br.s)、3.71(br.s)、3.83(br.s)、4.26(t)、4.46(br.s)、4.54(br.s)、4.92(s)、6.93(d)、7.13-7.20(m)、7.66(d)、8.69(s)

#### 【0220】

##### 【実施例2-19】

MTX- $\alpha$ -PheGly-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg、分子量：約230万)と実施例1-10で得られた化合物10(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。

#### 【0221】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約144万、MTXの結合率は1.8%であった。

#### 【0222】

<sup>1</sup>H-NMR(500MHz、D<sub>2</sub>O)： $\delta$  1.49(m)、1.60(m)、1.76(m)、2.01(br.s)、2.09-2.15(m)、2.20-2.28(m)、2.99-3.09(m)、3.10-3.17(m)、3.33(br.s)、3.51(br.s)、3.57(br.s)、3.71(br.s)、3.83(br.s)、4.30(m)、4.46(br.s)、4.55(br.d)、4.97(s)

、6．91（d）、7．13（m）、7．17－7．21（m）、7．67（d）、8．73（s）

#### 【0223】

##### 【実施例2－20】

MTX- $\alpha$ -PheGly-NHC<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>NH-HAの製造

実施例2－1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg，分子量：約230万）と実施例1－11で得られた化合物11（0．031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2－1と同様の方法で求めた分子量は約173万、MTXの結合率は1．6％であった。

#### 【0224】

この水溶液を実施例2－1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2－1と同様の方法で求めた分子量は約150万、MTXの結合率は1．6％であった。

#### 【0225】

<sup>1</sup>H-NMR（500MHz、D<sub>2</sub>O）： $\delta$  1．64（m）、1．78（m）、2．01（br．s）、2．09－2．17（m）、2．24（m）、3．01（m）、3．08（m）、3．16（m）、3．34（br．s）、3．51（br．s）、3．56（br．s）、3．71（br．s）、3．83（br．s）、4．31（m）、4．46（br．s）、4．54（br．s）、4．97（s）、6．91（d）、7．11（m）、7．14－7．21（m）、7．67（d）、8．72（s）

#### 【0226】

##### 【実施例2－21】

MTX- $\alpha$ -PheGly-NHC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>NH-HAの製造

実施例2－1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg，分子量：約230万）と実施例1－12で得られた化合物12（0．031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2－1と同様の方法で求めた分子量は約150万、MTXの結合率は2．3％であった。

#### 【0227】

この水溶液を実施例2－1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2－1と同様の方法で求めた分子量は約139万、MTXの結合率は2．3％であった。

#### 【0228】

##### 【実施例2－22】

MTX- $\alpha$ -PheGly-NHC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>ONH-HAの製造

実施例2－1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg，分子量：約230万）と実施例1－13で得られた化合物13（0．031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2－1と同様の方法で求めた分子量は約156万、MTXの結合率は2．0％であった。

#### 【0229】

この水溶液を実施例2－1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2－1と同様の方法で求めた分子量は約140万、MTXの結合率は2．2％であった。

#### 【0230】

##### 【実施例2－23】

MTX- $\alpha$ -PhePro-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2－1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg，分子量：約230万）と実施例1－14で得られた化合物14（0．031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2－1と同様の方法で求めた分子量は約166万、MTXの結合率は1．6％であった。

#### 【0231】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 152 万、MTX の結合率は 1.6 % であった。

【0232】

【実施例 2-24】

MTX- $\alpha$ -Phe $\beta$ Ala-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg, 分子量: 約 230 万) と実施例 1-15 で得られた化合物 15 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。

【0233】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 152 万、MTX の結合率は 1.5 % であった。

【0234】

【実施例 2-25】

MTX- $\alpha$ -Phe $\beta$ Ala-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg, 分子量: 約 230 万) と実施例 1-16 で得られた化合物 16 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 209 万、MTX の結合率は 2.3 % であった。

【0235】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 198 万、MTX の結合率は 2.3 % であった。

【0236】

【実施例 2-26】

MTX- $\alpha$ -Phe-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg, 分子量: 約 230 万) と実施例 1-17 で得られた化合物 17 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 213 万、MTX の結合率は 1.7 % であった。

【0237】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 179 万、MTX の結合率は 1.7 % であった。

【0238】

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  1.63 (m)、1.79 (m)、2.02 (br. s)、2.20 (m)、2.28 (m)、3.08 (m)、3.10-3.20 (m)、3.31 (s)、3.35 (br. s)、3.52 (br. s)、3.56 (br. s)、3.72 (br. s)、3.84 (br. s)、4.28 (t)、4.47 (br. s)、4.54 (br. s)、4.97 (s)、6.94 (d)、7.06 (t)、7.13 (d)、7.67 (d)、8.73 (s)

【0239】

【実施例 2-27】

MTX- $\alpha$ -Ile-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg, 分子量: 約 230 万) と実施例 1-18 で得られた化合物 18 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 192 万、MTX の結合率は 1.7 % であった。

【0240】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 162 万、MTX の結合率は 1.7 % であった。

【0241】

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz、 $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  0.84 (t)、0.89 (d)、1.18 (m)、1.47 (m)、1.78 (m)、1.83-1.90 (m)、2.02 (br. s)、2.36 (m)、3.24 (s)、3.35 (br. s)、3.51 (br. s)、3.57 (br. s)、3.63 (br. s)、3.71 (br. s)、3.83 (br. s)、4.09 (d)、4.45 (br. s)、4.55 (br. s)、4.93 (s)、6.92 (d)、7.72 (d)、8.68 (s)

【0242】

【実施例 2-28】

MTX- $\alpha$ -Ile-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg、分子量：約 230 万) と実施例 1-19 で得られた化合物 19 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 231 万、MTX の結合率は 2.1 % であった。

【0243】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 202 万、MTX の結合率は 2.1 % であった。

【0244】

【実施例 2-29】

MTX- $\alpha$ -Glu-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg、分子量：約 230 万) と実施例 1-20 で得られた化合物 20 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 201 万、MTX の結合率は 1.5 % であった。

【0245】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 183 万、MTX の結合率は 1.5 % であった。

【0246】

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz、 $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  1.57 (m)、1.77 (m)、2.02 (br. s)、2.25 (m)、2.37 (t)、3.24 (s)、3.25 (s)、3.35 (br. s)、3.51 (br. s)、3.56 (br. s)、3.71 (br. s)、3.83 (br. s)、4.13 (m)、4.22 (m)、4.36 (m)、4.46 (br. s)、4.55 (br. s)、4.91 (s)、6.94 (d)、7.76 (d)、8.66 (s)、8.68 (s)

注：下線部分はマイナーシグナルであり、これにより  $\alpha$  体と  $\gamma$  体の混合物と推定した。

【0247】

【実施例 2-30】

MTX- $\alpha$ -Glu-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg、分子量：約 230 万) と実施例 1-21 で得られた化合物 21 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 226 万、MTX の結合率は 2.1 % であった。

【0248】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 206 万、MTX の結合率は



2. 1%であった。

【0249】

【実施例2-31】

MTX- $\alpha$ -Tyr-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約230万）と実施例1-22で得られた化合物22（0.031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約190万、MTXの結合率は1.6%であった。

【0250】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約176万、MTXの結合率は1.7%であった。

【0251】

<sup>1</sup>H-NMR（500MHz、D<sub>2</sub>O）： $\delta$  1.63（m）、1.77（m）、2.02（br.s）、2.23-2.35（m）、2.95（m）、3.03-3.21（m）、3.34（br.s）、3.51（br.s）、3.58（br.s）、3.71（br.s）、3.83（br.s）、4.28（m）、4.47（br.d）、4.54（br.s）、4.92（s）、6.58（d）、6.94（d）、7.66（d）、8.68（s）

【0252】

【実施例2-32】

MTX- $\alpha$ -Trp-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約230万）と実施例1-23で得られた化合物23（0.031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約187万、MTXの結合率は1.9%であった。

【0253】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約139万、MTXの結合率は1.9%であった。

【0254】

<sup>1</sup>H-NMR（500MHz、D<sub>2</sub>O）： $\delta$  1.53（m）、1.74（m）、2.01（br.s）、2.09-2.15（m）、2.46（m）、2.85（m）、3.05（m）、3.35（br.s）、3.52（br.s）、3.58（br.s）、3.74（br.s）、3.83（br.s）、4.27（m）、4.48（br.d）、4.55（br.s）、6.83（d）、6.99（s）、7.05（s）、7.15（d）、7.43（d）、7.49（s）、8.74（s）

【0255】

【実施例2-33】

MTX- $\alpha$ -Ser-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約230万）と実施例1-24で得られた化合物24（0.031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約186万、MTXの結合率は1.7%であった。

【0256】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約165万、MTXの結合率は1.7%であった。

【0257】

<sup>1</sup>H-NMR（500MHz、D<sub>2</sub>O）： $\delta$  1.61（m）、1.76（m）、2.0

2 (b r . s)、2. 3 8 (t)、2. 5 1 (m)、3. 2 4 (s)、3. 2 5 (s)、  
3. 3 5 (b r . s)、3. 5 0 (b r . s)、3. 5 6 (b r . s)、3. 5 8 (b r  
. s)、3. 7 1 (b r . s)、3. 8 3 (b r . s)、4. 2 8 (m)、4. 3 9 (m  
)、4. 4 6 (b r . s)、4. 5 4 (b r . s)、4. 9 1 (s)、6. 9 3 (d)、  
7. 7 0 (d)、7. 7 6 (d)、8. 6 6 (s)、8. 6 8 (s)

注：下線部分はマイナーシグナルであり、これにより $\alpha$ 体と $\gamma$ 体の混合物と推定した。

【0258】

【実施例2-34】

MTX- $\alpha$ -Leu-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約230万）と実施例1-25で得られた化合物25（0.031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約189万、MTXの結合率は1.7%であった。

【0259】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約147万、MTXの結合率は1.6%であった。

【0260】

<sup>1</sup>H-NMR（500MHz、D<sub>2</sub>O）： $\delta$  0.84 (d)、0.89 (d)、1.52-1.68 (m)、1.72-1.83 (m)、2.01 (b r . s)、2.45 (t)、3.34 (b r . s)、3.50 (b r . s)、3.57 (b r . s)、3.72 (b r . s)、3.83 (b r . s)、4.28 (m)、4.45 (b r . d)、4.54 (b r . s)、4.95 (s)、6.91 (d)、7.72 (d)、8.69 (s)

【0261】

【実施例2-35】

MTX- $\alpha$ -Val-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約230万）と実施例1-26で得られた化合物26（0.031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約187万、MTXの結合率は1.7%であった。

【0262】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約156万、MTXの結合率は1.7%であった。

【0263】

<sup>1</sup>H-NMR（500MHz、D<sub>2</sub>O）： $\delta$  0.93 (m)、1.78 (m)、2.01 (b r . s)、2.11-2.19 (m)、2.47 (m)、3.24 (s)、3.34 (b r . s)、3.51 (b r . s)、3.57 (b r . s)、3.63 (b r . s)、3.72 (b r . s)、3.83 (b r . s)、4.02 (d)、4.47 (b r . d)、4.54 (b r . s)、4.95 (s)、6.91 (d)、7.72 (d)、8.69 (s)

【0264】

【実施例2-36】

MTX- $\alpha$ -His-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩（500mg、分子量：約230万）と実施例1-27で得られた化合物27（0.031mmol）を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約191万、MTXの結合率は1.2%であった。

【0265】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水

溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 162 万、MTX の結合率は 1.2 % であった。

【0266】

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz、 $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  1.70 (m)、1.79 (m)、2.01 (br. s)、2.23-2.36 (m)、3.13-3.22 (m)、3.26 (s)、3.34 (br. s)、3.50 (br. s)、3.56 (br. s)、3.61 (br. s)、3.71 (br. s)、3.83 (br. s)、4.33 (t)、4.46 (br. d)、4.54 (br. s)、4.96 (s)、6.92 (d)、7.30 (s)、7.73 (d)、8.57 (s)、8.70 (s)

【0267】

【実施例 2-37】

MTX- $\alpha$ -Pro-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg、分子量：約 230 万) と実施例 1-28 で得られた化合物 28 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 167 万、MTX の結合率は 1.5 % であった。

【0268】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 152 万、MTX の結合率は 1.6 % であった。

【0269】

【実施例 2-38】

MTX- $\alpha$ - $\beta$ Ala-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg、分子量：約 230 万) と実施例 1-29 で得られた化合物 29 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 191 万、MTX の結合率は 1.7 % であった。

【0270】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 143 万、MTX の結合率は 1.7 % であった。

【0271】

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz、 $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  1.60 (m)、1.67 (m)、1.79 (m)、2.01 (br. s)、2.42 (m)、2.47 (m)、3.09 (t)、3.14 (t)、3.34 (br. s)、3.51 (br. s)、3.57 (br. s)、3.73 (br. s)、3.82 (br. s)、4.47 (br. s)、4.54 (br. d)、4.96 (s)、6.92 (d)、7.73 (d)、8.70 (s)

【0272】

【実施例 2-39】

MTX- $\gamma$ -PhePhe-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg、分子量：約 230 万) と実施例 1-30 で得られた化合物 30 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 209 万、MTX の結合率は 1.5 % であった。

【0273】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 188 万、MTX の結合率は 1.5 % であった。

【0274】

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz、 $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  1.52 (m)、1.81 (m)、2.0

2 (b r . s ) 、 2 . 1 6 - 2 . 2 9 (m ) 、 2 . 6 0 (m ) 、 2 . 7 6 (m ) 、 2 . 9 9 (m ) 、 3 . 0 7 (m ) 、 3 . 1 8 - 3 . 2 6 (m ) 、 3 . 3 2 (s ) 、 3 . 3 5 (b r . s ) 、 3 . 5 2 (b r . s ) 、 3 . 5 6 (b r . s ) 、 3 . 6 6 (b r . s ) 、 3 . 7 3 (b r . s ) 、 3 . 8 4 (b r . s ) 、 4 . 1 5 (t ) 、 4 . 2 7 (t ) 、 4 . 3 6 (m ) 、 4 . 4 7 (b r . s ) 、 4 . 5 5 (b r . d ) 、 6 . 8 6 (d ) 、 6 . 9 2 - 6 . 9 9 (m ) 、 7 . 0 2 - 7 . 1 6 (m ) 、 7 . 7 9 (d ) 、 8 . 7 1 (s )

【 0 2 7 5 】

【実施例 2-40】

MTX- $\gamma$ -P h e P h e -N H C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> N H -H A の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500mg, 分子量: 約 230 万) と実施例 1-31 で得られた化合物 31 (0.031mmol) を反応させ、標題の H A -M T X 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 189 万、M T X の結合率は 2.0% であった。

【 0 2 7 6 】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の H A -M T X 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 176 万、M T X の結合率は 2.0% であった。

【 0 2 7 7 】

<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  2.02 (b r . s ) 、 2.15 - 2.24 (m ) 、 2.60 (m ) 、 2.74 - 2.83 (m ) 、 3.12 - 3.19 (m ) 、 3.20 - 3.23 (m ) 、 3.29 (s ) 、 3.35 (b r . s ) 、 3.51 (b r . s ) 、 3.57 (b r . s ) 、 3.71 (b r . s ) 、 3.83 (b r . s ) 、 4.21 (t ) 、 4.26 (t ) 、 4.32 (m ) 、 4.46 (b r . s ) 、 4.55 (b r . d ) 、 6.84 (s ) 、 6.93 (d ) 、 7.00 - 7.13 (m ) 、 7.76 (d ) 、 8.64 (s )

【 0 2 7 8 】

【実施例 2-41】

MTX- $\gamma$ -P h e P h e -N H C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O N H -H A の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500mg, 分子量: 約 230 万) と実施例 1-32 で得られた化合物 32 (0.031mmol) を反応させ、標題の H A -M T X 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 196 万、M T X の結合率は 2.1% であった。

【 0 2 7 9 】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の H A -M T X 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 180 万、M T X の結合率は 2.1% であった。

【 0 2 8 0 】

【実施例 2-42】

MTX- $\gamma$ -P h e G l y -N H C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> N H -H A の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500mg, 分子量: 約 230 万) と実施例 1-33 で得られた化合物 33 (0.031mmol) を反応させ、標題の H A -M T X 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 190 万、M T X の結合率は 1.4% であった。

【 0 2 8 1 】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の H A -M T X 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 172 万、M T X の結合率は 1.5% であった。

【 0 2 8 2 】

<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  1.69 (m ) 、 1.79 (m ) 、 2.02 (b r . s ) 、 2.19 - 2.26 (m ) 、 2.29 (m ) 、 2.66 (m ) 、 2.8

2 (m)、3. 13 (m)、3. 20 (m)、3. 29 (s)、3. 34 (br. s)、3. 51 (br. s)、3. 56 (br. s)、3. 71 (br. s)、3. 83 (br. s) 4. 16 (t)、4. 33 (m)、4. 46 (br. s)、4. 54 (br. s)、4. 94 (d)、6. 82 (s)、6. 99-7. 08 (m)、7. 75 (d)、8. 68 (s)

【0283】

【実施例2-43】

MTX- $\gamma$ -Phe-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg、分子量：約230万)と実施例1-34で得られた化合物34(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約187万、MTXの結合率は1.7%であった。

【0284】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約165万、MTXの結合率は1.7%であった。

【0285】

<sup>1</sup>H-NMR(500MHz、D<sub>2</sub>O)： $\delta$  1.44 (m)、1.80 (m)、2.02 (br. s)、2.31 (m)、2.53 (m)、2.68 (m)、2.88 (m)、3.01 (m)、3.13 (m)、3.18 (m)、3.31 (s)、3.35 (br. s)、3.51 (br. s)、3.58 (br. s)、3.63 (br. s)、3.72 (br. s)、3.84 (br. s)、4.02 (t)、4.37 (m)、4.47 (br. s)、4.55 (br. s)、4.86 (d)、4.98 (d)、6.76 (d)、7.02-7.09 (m)、7.78 (d)、8.72 (s)

【0286】

【実施例2-44】

MTX- $\gamma$ -Glu-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg、分子量：約230万)と実施例1-35で得られた化合物35(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約179万、MTXの結合率は1.6%であった。

【0287】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約149万、MTXの結合率は1.7%であった。

【0288】

<sup>1</sup>H-NMR(500MHz、D<sub>2</sub>O)： $\delta$  1.61-1.71 (m)、1.73-1.88 (m)、2.01 (br. s)、2.23 (m)、2.32 (t)、2.38-2.55 (m)、3.07 (m)、3.34 (br. s)、3.51 (br. s)、3.56 (br. s)、3.73 (br. s)、3.83 (br. s) 4.15 (m)、4.46 (br. s)、4.55 (br. s)、4.95 (s)、6.91 (d)、7.70 (d)、8.71 (s)

【0289】

【実施例2-45】

MTX- $\alpha$ -D-Phe-D-Phe-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg、分子量：約230万)と実施例1-36で得られた化合物36(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約148万、MTXの結合率は1.4%であった。

【0290】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 135 万、MTX の結合率は 1.4 % であった。

【0291】

【実施例 2-46】

MTX- $\gamma$ -D-Phe-D-Phe-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg, 分子量: 約 230 万) と実施例 1-37 で得られた化合物 37 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 160 万、MTX の結合率は 1.4 % であった。

【0292】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 141 万、MTX の結合率は 1.3 % であった。

【0293】

【実施例 2-47】

MTX- $\alpha$ -Asn Phe Phe-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg, 分子量: 約 230 万) と実施例 1-38 で得られた化合物 38 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 210 万、MTX の結合率は 1.3 % であった。

【0294】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 178 万、MTX の結合率は 1.2 % であった。

【0295】

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  1.60 (m), 1.80 (m), 2.02 (br. s), 2.34 (m), 2.54 (m), 2.60-3.05 (m), 3.35 (br. s), 3.52 (br. s), 3.57 (br. s), 3.64 (br. s), 3.72 (br. s), 3.83 (br. s), 4.28 (m), 4.46 (br. s), 4.55 (br. s), 6.61 (d), 6.77 (t), 6.82-7.36 (m), 7.76 (d), 7.80 (d), 8.61 (s), 8.64 (s)

注: 下線部分はマイナーシグナルであり、これにより  $\alpha$  体と  $\gamma$  体の混合物と推定した。

【0296】

【実施例 2-48】

MTX- $\alpha/\gamma$ -Gly Phe Leu Gly-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HA の製造

実施例 2-1 と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩 (500 mg, 分子量: 約 230 万) と実施例 1-39 で得られた化合物 39 (0.031 mmol) を反応させ、標題の HA-MTX 結合体の水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 206 万、MTX の結合率は 1.4 % であった。

【0297】

この水溶液を実施例 2-1 と同様の方法で精製し、標題の HA-MTX 結合体の無菌水溶液を得た。実施例 2-1 と同様の方法で求めた分子量は約 185 万、MTX の結合率は 1.3 % であった。

【0298】

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  0.72 (d), 0.77 (d), 0.81 (d), 1.32 (m), 1.50 (m), 1.67-1.82 (m), 2.01 (br. s), 2.23 (m), 2.33 (m), 2.75-3.03 (m), 3.51 (br. s), 3.58 (br. s), 3.71 (br. s), 3.83 (br. s), 4.16-4.28 (m), 4.46 (br. s), 4.54 (br. s), 6.85 (d)

、6.92-7.06 (m)、7.75 (d)、7.78 (d)、8.63 (s)、8.65 (s)

注：下線部分はマイナーシグナルであり、これにより $\alpha$ 体と $\gamma$ 体の混合物と推定した。

#### 【0299】

##### 【実施例2-49】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg、分子量：約32万)と実施例1-2で得られた化合物2(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。

#### 【0300】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約33万、MTXの結合率は1.1%であった。

#### 【0301】

<sup>1</sup>H-NMR(500MHz、D<sub>2</sub>O)： $\delta$  1.67 (m)、1.79 (m)、1.84-1.94 (m)、2.02 (br. s)、2.12-2.20 (m)、2.59 (m)、2.77 (m)、2.91 (m)、2.99 (m)、3.12-3.25 (m)、3.35 (br. s)、3.49 (br. s)、3.51 (br. s)、3.57 (br. s)、3.71 (br. s)、3.83 (br. s) 4.18 (t)、4.45 (br. d)、4.55 (br. d)、4.88 (d)、4.96 (d)、6.76 (d)、6.95-7.10 (m)、7.72 (d)、8.68 (s)

#### 【0302】

##### 【実施例2-50】

MTX- $\alpha$ -PhePhe-NHC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NH-HAの製造

実施例2-1と同様の方法で、ヒアルロン酸ナトリウム塩(500mg、分子量：約34万)と実施例1-1で得られた化合物1(0.031mmol)を反応させ、標題のHA-MTX結合体の水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約34万、MTXの結合率は2.0%であった。

#### 【0303】

この水溶液を実施例2-1と同様の方法で精製し、標題のHA-MTX結合体の無菌水溶液を得た。実施例2-1と同様の方法で求めた分子量は約34万、MTXの結合率は1.9%であった。

#### 【0304】

<sup>1</sup>H-NMR(500MHz、D<sub>2</sub>O)： $\delta$  1.83 (m)、2.01 (br. s)、2.12 (m)、2.52 (t)、2.69 (m)、2.95 (m)、3.34 (br. d)、3.49 (br. d)、3.57 (br. s)、3.70 (br. s)、3.83 (br. s)、4.16 (t)、4.45 (br. d)、4.54 (br. d)、4.87 (d)、4.96 (d)、6.66 (d)、6.88-7.09 (m)、7.72 (d)、8.68 (s)

上記実施例2-1～2-50で得られた本発明のHA-MTX結合体を以下の表にまとめた。

#### 【0305】

【表 1 - 1】

	結合位置 ( $\alpha/\gamma$ )	ペプチド鎖を含有するリンカー	水溶液		無菌水溶液	
			MTXの 結合率 (%)	結合体の 分子量 (ダルトン)	MTXの 結合率 (%)	結合体の 分子量 (ダルトン)
実施例 2-1	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.1	195 万	2.1	186 万
実施例 2-2	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	1.9	228 万	1.9	218 万
実施例 2-2'	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.2	219 万	2.3	206 万
実施例 2-3	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	0.6	232 万	0.5	217 万
実施例 2-4	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	1.1	232 万	1.1	223 万
実施例 2-5	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	1.4	227 万	1.3	209 万
実施例 2-6	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	3.9	205 万	3.8	191 万
実施例 2-7	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	4.5	197 万	4.4	174 万
実施例 2-8	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH	1.6	211 万	1.4	198 万
実施例 2-9	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> -NH-	1.8	183 万	1.7	155 万
実施例 2-10	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> -NH-	1.6	189 万	1.6	162 万
実施例 2-11	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> -NH-	1.9	192 万	2.0	162 万
実施例 2-12	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O-NH-	2.0	172 万	1.9	149 万
実施例 2-13	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> -NH-	1.4	214 万	1.2	196 万
実施例 2-14	$\alpha$	-Phe-Phe-Lys-	1.4	189 万	1.4	172 万
実施例 2-15	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.4	83 万	1.4	80 万
実施例 2-16	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	0.5	83 万	0.5	81 万
実施例 2-17	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	3.4	77 万	3.4	76 万

【 0 3 0 6 】



【表 1 - 2】

实施例 2 - 1 8	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.5	199 万	1.4	186 万
实施例 2 - 1 9	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> -NH-	NT	NT	1.8	144 万
实施例 2 - 2 0	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> -NH-	1.6	173 万	1.6	150 万
实施例 2 - 2 1	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> -NH-	2.3	150 万	2.3	139 万
实施例 2 - 2 2	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O-NH-	2.0	156 万	2.2	140 万
实施例 2 - 2 3	$\alpha$	-Phe-Pro-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.6	166 万	1.6	152 万
实施例 2 - 2 4	$\alpha$	-Phe- $\beta$ Ala-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	NT	NT	1.5	152 万
实施例 2 - 2 5	$\alpha$	-Phe- $\beta$ Ala-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.3	209 万	2.3	198 万
实施例 2 - 2 6	$\alpha$	-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	213 万	1.7	179 万
实施例 2 - 2 7	$\alpha$	-Ile-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	192 万	1.7	162 万
实施例 2 - 2 8	$\alpha$	-Ile-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.1	231 万	2.1	202 万
实施例 2 - 2 9	$\alpha$	-Glu-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.5	201 万	1.5	183 万
实施例 2 - 3 0	$\alpha$	-Glu-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.1	226 万	2.1	206 万
实施例 2 - 3 1	$\alpha$	-Tyr-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.6	190 万	1.7	176 万
实施例 2 - 3 2	$\alpha$	-Trp-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.9	187 万	1.9	139 万
实施例 2 - 3 3	$\alpha/\gamma$	-Ser-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	186 万	1.7	165 万
实施例 2 - 3 4	$\alpha$	-Leu-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	189 万	1.6	147 万
实施例 2 - 3 5	$\alpha$	-Val-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	187 万	1.7	156 万
实施例 2 - 3 6	$\alpha$	-His-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.2	191 万	1.2	162 万
实施例 2 - 3 7	$\alpha$	-Pro-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.5	167 万	1.6	152 万
实施例 2 - 3 8	$\alpha$	- $\beta$ Ala-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	191 万	1.7	143 万
实施例 2 - 3 9	$\gamma$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.5	209 万	1.5	188 万
实施例 2 - 4 0	$\gamma$	-Phe-Phe-NH-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> -NH-	2.1	189 万	2.0	176 万
实施例 2 - 4 1	$\gamma$	-Phe-Phe-NH-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O-NH-	2.1	196 万	2.1	180 万

【 0 3 0 7 】

【表 1 - 3】

実施例 2-42	$\gamma$	-Phe-Gly-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.4	190 万	1.5	172 万
実施例 2-43	$\gamma$	-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	187 万	1.7	165 万
実施例 2-44	$\gamma$	-Glu-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.6	179 万	1.7	149 万
実施例 2-45	$\alpha$	-Dphe-DPhe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.4	148 万	1.4	135 万
実施例 2-46	$\gamma$	-Dphe-DPhe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.4	160 万	1.3	141 万
実施例 2-47	$\alpha/\gamma$	-Asn-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.3	210 万	1.2	178 万
実施例 2-48	$\alpha/\gamma$	-Gly-Phe-Leu-Gly-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.4	206 万	1.3	185 万
実施例 2-49	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	NT	NT	1.1	33 万
実施例 2-50	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.0	34 万	1.9	34 万

【0308】

## 【実験例 1】

粘弾性の測定

ヒアルロン酸（分子量 190 万、80 万）と実施例 2-1、2-8、2-18、2-27 および 2-29 の結合体の無菌水溶液の粘弾性を、CSL500 型ストレス制御式レオメーター（Carri-Med 社製）で、直径 4 cm のコーンを用い、37℃で測定した。図 1 のように、各結合体は分子量 80 万と 190 万のヒアルロン酸の中間の粘弾性を示した。

【0309】

## 【実験例 2】

滑膜細胞増殖抑制作用

ヒト滑膜細胞（HFLS）を用いて、TNF- $\alpha$  刺激による細胞増殖亢進に対する本発明の HA-MTX 結合体の影響を検討した。

【0310】

被験物質として実施例 2 の HA-MTX 結合体の無菌水溶液（表 2）を使用した。HFLS（CA40405、Lot No. : 1413, 1493）はCELL APPLICATIONS INS. より購入して使用した。

【0311】

HFLS は 96 穴プレート（Falcon）に 5000 cells/well で播種して 5% FBS、1x Antibiotic-Antimycotic（GIBCO）含有 Iscove's modified Dulbecco's medium（IMDM）培地にて 3 時間培養した。細胞付着後、TNF- $\alpha$ （最終濃度 10 ng/mL）、各濃度の HA-MTX 結合体を添加して 5 日間培養した。培養終了 2 日前に、37 kBq/well の [<sup>3</sup>H]-デオキシウリジン（MORAVEK）を加え、細胞内への [<sup>3</sup>H]-デオキシウリジン取り込み量（放射活性）をシンチレーションカウンターで測定した。細胞の回収は 0.05% トリプシン-0.2% EDTA で細胞を剥がして行った。

【0312】

各実験で測定した各被験物質の放射活性は、被験物質を添加せず培養した群の放射活性を control として、相対値 (% of control) を算出した。HA-MTX 結合体の MTX 濃度は、ヒアルロン酸 1 mg/mL あたりフリーのカルボキシル基が  $2.49 \times 10^{-3}$  mol/L（1 g/401 L : 401 は N-アセチルグルコサミン+グルクロン酸の分子量）であることから、この値に MTX の結合率を乗して算出した。（MTX 結合率 1% の HA-MTX 結合体 1 mg/mL 場合、MTX 濃度は  $2.49 \times 10^{-5}$  mol/L とした

。 ) 得られた値を使用して 4 parameter logistic 法 ( 解析ソフト GraphPad Prism 3.02 ) により細胞増殖阻害活性 ( IC<sub>50</sub> 値 ) を算出した。

【 0 3 1 3 】

HFLS における HA-MTX 結合体の IC<sub>50</sub> 値を表 2 に示す。

【 0 3 1 4 】

【 表 2 - 1 】

表 2 TNF- $\alpha$  刺激したヒト滑膜細胞の増殖抑制作用

	結合位置 ( $\alpha/\gamma$ )	ペプチド鎖を含有するリンカー	MTX の 結合率 (%)	結合体の 分子量 (ダルトン)	IC <sub>50</sub> (mol/L)
実施例 1	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.1	186 万	3.6E-07
実施例 2	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	1.9	218 万	1.4E-07
実施例 2'	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.3	206 万	7.2E-07
実施例 4	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	1.1	223 万	1.1E-05
実施例 5	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	1.3	209 万	1.1E-06
実施例 6	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	3.8	191 万	9.1E-08
実施例 8	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.4	198 万	8.4E-07
実施例 9	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> -NH-	1.7	155 万	1.3E-06
実施例 10	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> -NH-	1.6	162 万	1.2E-06
実施例 11	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> -NH-	2.0	162 万	2.5E-07
実施例 12	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O-NH-	1.9	149 万	3.0E-07
実施例 13	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> -NH-	1.2	196 万	1.5E-06
実施例 14	$\alpha$	-Phe-Phe-Lys-	1.4	172 万	1.5E-05
実施例 15	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.4	80 万	4.8E-07
実施例 16	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	0.5	81 万	1.3E-05
実施例 17	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	3.4	76 万	1.3E-05
実施例 18	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.4	186 万	9.2E-06
実施例 19	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> -NH-	1.8	144 万	5.4E-06

【 0 3 1 5 】

【表 2 - 2】

実施例 20	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> -NH-	1.6	150 万	1.8E-05
実施例 21	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> -NH-	2.3	139 万	8.3E-07
実施例 22	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O-NH-	2.2	140 万	3.0E-06
実施例 23	$\alpha$	-Phe-Pro-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.6	152 万	1.2E-05
実施例 24	$\alpha$	-Phe- $\beta$ Ala-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.5	152 万	3.5E-06
実施例 25	$\alpha$	-Phe- $\beta$ Ala-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.3	198 万	2.9E-07
実施例 26	$\alpha$	-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	179 万	1.7E-06
実施例 27	$\alpha$	-Ile-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	162 万	3.1E-06
実施例 28	$\alpha$	-Ile-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.1	202 万	1.2E-05
実施例 29	$\alpha$	-Glu-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.5	183 万	8.4E-06
実施例 30	$\alpha$	-Glu-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.1	206 万	5.4E-05
実施例 31	$\alpha$	-Tyr-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	176 万	7.0E-06
実施例 32	$\alpha$	-Trp-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.9	139 万	4.7E-06
実施例 33	$\alpha$	-Ser-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	165 万	3.6E-05
実施例 34	$\alpha$	-Leu-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.6	147 万	3.6E-06
実施例 35	$\alpha$	-Val-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	156 万	1.1E-05
実施例 36	$\alpha$	-His-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.2	162 万	1.7E-05
実施例 39	$\gamma$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.5	188 万	3.2E-06
実施例 42	$\gamma$	-Phe-Gly-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.5	172 万	1.4E-05
実施例 47	$\alpha/\gamma$	-Asn-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.2	178 万	1.1E-06
実施例 48	$\alpha/\gamma$	-Gly-Phe-Leu-Gly-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.3	185 万	1.3E-06
実施例 49	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.1	33 万	1.3E-05

## 【0316】

表 2 の結果より、検討した HA-MTX 結合体はいずれも TNF- $\alpha$  刺激による HFLS の細胞増殖亢進を抑制する作用を有することが確認された。

## 【0317】

## 【実験例 3】

mBSA 誘導単関節炎モデルに対する膝関節腫脹抑制効果

本発明の HA-MTX 結合体の *in vivo* での滑膜炎抑制作用を、ラット methylated bovine serum albumin (mBSA) 誘導単関節炎モデルの膝関節腫脹の抑制効果にて評価した。

## 【0318】

動物は LEW/Crj 系ラット（日本チャールズ・リバー、6 週齢、雄）を使用した。関節炎を誘導する 21 日および 14 日前に、2 mg/mL の mBSA (Calbiochem)

em) 水溶液と等量のFreund's incomplete adjuvant (Difco) で作製した乳濁液 0.5 mL をラットのわき腹に皮下投与した。関節炎は 2 mg/mL の mBSA 水溶液 50  $\mu$  L を右膝関節内投与して誘導した。左膝関節は無処置で各個体のコントロールとした。被験物質 (無菌水溶液) および対照薬であるヒアルロン酸は関節炎誘導 7 日および 1 日前と 7 日後に、50  $\mu$  L を右膝関節内投与した。

#### 【0319】

膝関節腫脹の測定は両膝関節の幅をノギスで測定して、左右差 (右膝直径 - 左膝直径) を膝関節腫脹とした。関節炎誘導直前より 2 週間後まで週 2 回の頻度で膝関節幅を測定して、その経時的推移から AUC を算出した。測定時ごとに AUC の平均値および標準偏差を算出し、被検物質投与群と HA 投与群間に対応のない t 検定を行い、危険率 5 % 未満の場合に有意差ありと判断した。統計解析は SAS version 6.12 (SAS インスティテュートジャパン) を使用した。また、各被験物質の AUC は HA 投与群を control として、各被験物質の相対値 (% of control) を算出した。

#### 【0320】

本発明の各 HA-MTX 結合体の効果を上記の方法で検討した結果を表 3 に示す。

#### 【0321】

【表 3】

表 3 mBSA 誘導単関節炎モデルの関節腫脹に対する HA-MTX 結合体の抑制作用

	結合位置 ( $\alpha/\gamma$ )	ペプチド鎖を含有するリンカー	MTX の 結 合率 (%)	結合体の 分子量 (ダルトン)	AUC (% of control) (mean $\pm$ SEM)	P 値
実施例 1	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.1	186 万	48.5 $\pm$ 5.3	P<0.0001
実施例 2	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	1.9	218 万	45.0 $\pm$ 7.3	P<0.0001
実施例 2'	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.3	206 万	65.5 $\pm$ 7.5	P<0.005
実施例 3	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	0.5	217 万	76.2 $\pm$ 7.7	P<0.05
実施例 4	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	1.1	223 万	69.0 $\pm$ 6.5	P<0.005
実施例 5	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	1.3	209 万	51.9 $\pm$ 3.7	P<0.0001
実施例 6	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	3.8	191 万	39.5 $\pm$ 7.2	P<0.0001
実施例 7	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	4.4	174 万	44.9 $\pm$ 4.5	P<0.0001
実施例 8	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.4	198 万	49.3 $\pm$ 7.8	P<0.005
実施例 10	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> -NH-	1.6	162 万	63.5 $\pm$ 9.2	P<0.05
実施例 13	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> -NH-	1.2	196 万	60.5 $\pm$ 9.9	P<0.01
実施例 14	$\alpha$	-Phe-Phe-Lys-	1.4	172 万	54.1 $\pm$ 7.4	P<0.0005
実施例 17	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	3.4	76 万	56.1 $\pm$ 8.3	P<0.01
実施例 18	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.4	186 万	61.5 $\pm$ 4.7	P<0.005
実施例 20	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> -NH-	1.6	150 万	65.3 $\pm$ 9.6	P<0.01
実施例 21	$\alpha$	-Phe-Gly-NH-C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> -NH-	2.3	139 万	47.3 $\pm$ 8.8	P<0.0005
実施例 27	$\alpha$	-Ile-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	162 万	75.1 $\pm$ 6.8	P<0.05
実施例 28	$\alpha$	-Ile-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.1	202 万	63.5 $\pm$ 4.7	P<0.005
実施例 29	$\alpha$	-Glu-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.5	183 万	68.8 $\pm$ 6.7	P<0.005
実施例 30	$\alpha$	-Glu-NH-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -NH-	2.1	206 万	58.3 $\pm$ 7.4	P<0.005
実施例 31	$\alpha$	-Tyr-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	176 万	69.0 $\pm$ 6.7	P<0.005
実施例 38	$\alpha$	- $\beta$ Ala-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.7	143 万	67.6 $\pm$ 4.4	P<0.0005
実施例 41	$\alpha$	-Phe-Phe-NH-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O-NH-	2.1	180 万	68.0 $\pm$ 8.9	P<0.05
実施例 47	$\alpha/\gamma$	-Asn-Phe-Phe-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.2	178 万	42.1 $\pm$ 6.3	P<0.001
実施例 48	$\alpha/\gamma$	-Gly-Phe-Leu-Gly-NH-C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	1.3	185 万	58.8 $\pm$ 11.6	P<0.05

## 【0322】

表 3 に示される結果より、今回検討した HA-MTX 結合体はいずれも、HA 投与群に比べ、関節炎モデルの膝関節腫脹を有意に抑制することが明らかとなった。また、HA に

結合するMTXの結合率の影響に注目すると、MTXの結合率が0.5から4.4%（実施例1～7）で、関節炎モデルの膝関節腫脹をHA投与群に比べて有意に抑制することが示唆された。

#### 【0323】

本発明のHA-MTX結合体の有用性を検証する目的で、1）実施例2で調製したHA-MTX結合体（無菌水溶液）投与群、2）HA-MTX結合体に含有するMTXと同量のMTX溶液投与群および3）結合体に含有する同量のMTXおよびヒアルロン酸（HA）の混合物（HA+MTX）投与群間で関節腫脹抑制作用を比較した。本試験の膝関節腫脹の経時的推移を図2に、及びそのAUCを図3に示す。図2および図3に示される結果より、MTX単体およびMTXとHA混合体に比べ、HA-MTX結合体は関節炎モデルの関節腫脹に対する著しく強い抑制作用を有することが確認された。従って、MTXとHAとの結合は、MTXの関節腫脹抑制作用を著しく向上させることが明らかとなった。

#### 【0324】

以上のことより、本発明のHA-MTX結合体は、HAには認められない*in vitro*でのTNF- $\alpha$ 刺激によるヒト滑膜細胞の増殖抑制作用、*in vivo*での関節炎を発症するモデルの滑膜炎を軽減する作用を有することが明らかとなった。また、関節炎モデルにおいては、MTX単独およびHAとMTXの混合物では十分な滑膜炎の軽減作用が認められないのに対し、HA-MTX結合体は強力な滑膜炎の軽減作用を発揮することが明らかとなった。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0325】

本発明のHA-MTX結合体により、関節注入剤としてのHAの側面を持ちながら、MTXの滑膜炎抑制作用を投与関節内でのみ安全に発現させることができる、従来にない効果を有する、優れた関節疾患治療薬が提供される。

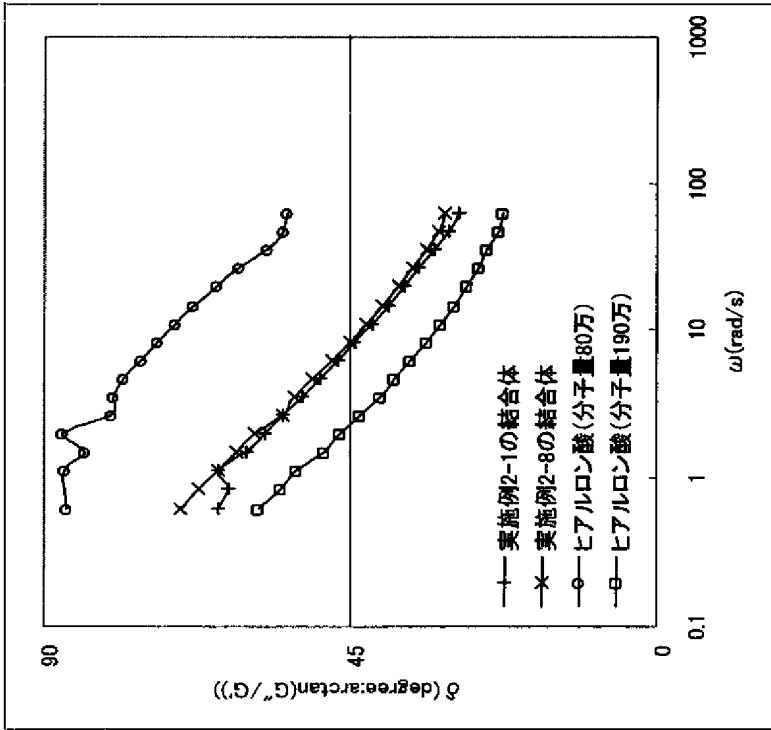
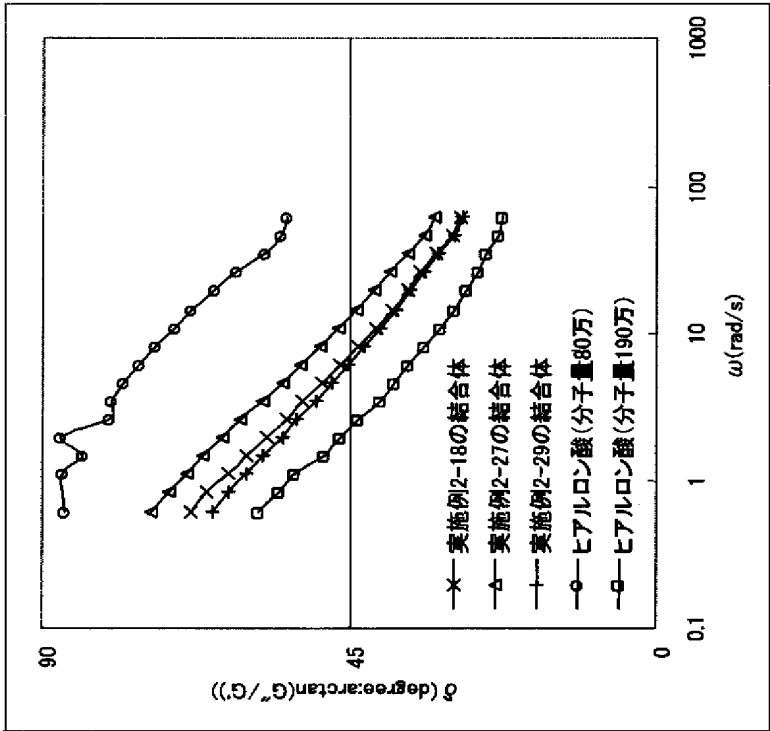
#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0326】

【図1】各被検物質および対照（分子量190万のヒアルロン酸および分子量80万のヒアルロン酸）の、粘弾性を測定した結果を示す。

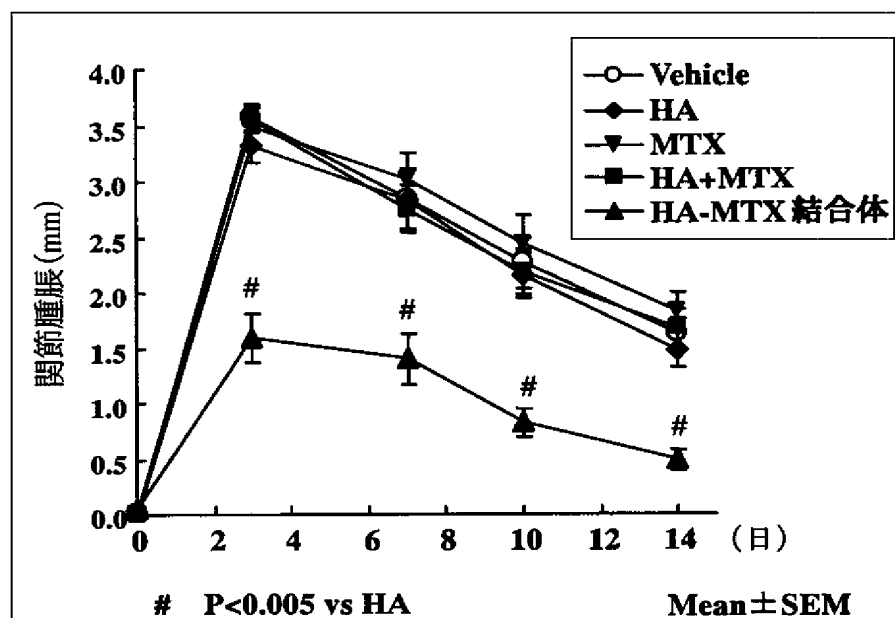
【図2】各被検物質投与群および対照群（HAおよびvehicle）における、mBSAを膝関節内に投与直後からの膝関節腫脹の経時的推移を示す。

【図3】図2の各被検物質投与群および対照群のグラフについてのAUCを示す。

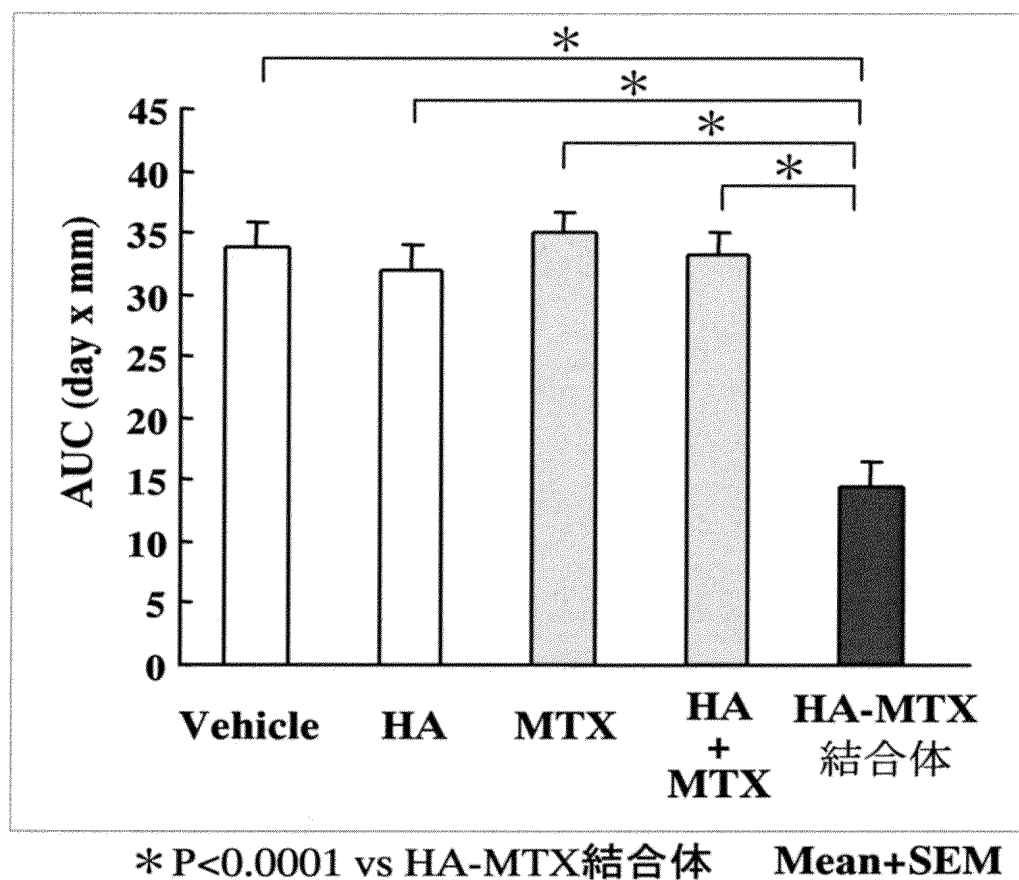




【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

関節疾患治療薬として有用な、ヒアルロン酸－メトトレキサート結合体を提供することである。

【解決手段】

ヒアルロン酸のカルボキシル基に、１～８個のアミノ酸からなるペプチド鎖を含有するリンカーを介してメトトレキサートが結合した、ヒアルロン酸－メトトレキサート結合体が、関節疾患治療薬として有用であることを見出した。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書  
【提出日】 平成16年 7月20日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2004-167755  
【補正をする者】  
【識別番号】 000003311  
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100089705  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 社本 一夫  
【電話番号】 03-3270-6641  
【ファクシミリ番号】 03-3246-0233  
【手続補正1】  
【補正対象書類名】 特許願  
【補正対象項目名】 委任状  
【補正方法】 追加  
【補正の内容】  
【提出物件の目録】  
【物件名】 委任状 1



11

## 委任状

平成 16 年 7 月 8 日

私（私ども）は、

識別番号 100089705 弁理士 社本 一夫氏、

識別番号 100076691 弁理士 増井 忠武氏、

識別番号 100075270 弁理士 小林 泰氏、

識別番号 100080137 弁理士 千葉 昭男氏、

識別番号 100096013 弁理士 富田 博行氏、

を以て代理人として下記事項を委任します。

1. 特願 2004-167755 に関する手続
1. 上記出願に基づく特許法第 41 条第 1 項又は実用新案法第 8 条第 1 項の規定による優先権の主張及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権に基づく権利及びこれらの権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に関する特許法第 64 条の 2 第 1 項の規定による出願公開の請求
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録に対する無効審判の請求に関する手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること
1. 特願 2004-62616 に基づく特許法第 41 条第 1 項又は実用新案法第 8 条第 1 項の規定による優先権の主張及びその取下げ

住 所 東京都千代田区有楽町 1 丁目 4 番 1 号

名 称 電気化学工業株式会社

代表者

取締役社長 書間 敏男



## 出願人履歴

0 0 0 0 0 3 2 9 6

20001204

住所変更

東京都千代田区有楽町 1 丁目 4 番 1 号

電気化学工業株式会社

0 0 0 0 0 3 3 1 1

19900905

新規登録

5 9 6 0 5 8 8 8 9

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

中外製薬株式会社